

ラット胃粘膜主細胞の機能と pepsinogen 分泌の
調節に関する研究

乙第23号

田 中 享

ラット胃粘膜主細胞の機能と pepsinogen 分泌の
調節に関する研究

田 中 享

目次

総論の部	-----	1
緒言	-----	1
第1章 胃粘膜主細胞の単離と pepsinogen 及び intrinsic factor		
の分泌に関する基礎的検討	-----	3
第1節 胃粘膜遊離細胞からの主細胞の分離	-----	4
第2節 培養ラット胃主細胞からの pepsinogen 分泌に対する		
分泌促進物質の影響	-----	7
第3節 ラット胃主細胞における各種分泌促進物質による		
細胞内 Ca^{2+} の変化	-----	10
第4節 ラット胃主細胞における各種分泌促進物質の細胞内		
cAMP 産生に対する作用	-----	13
第5節 ラット胃主細胞からの intrinsic factor 分泌の検討	-----	16
第6節 考察	-----	20
第2章 Pepsinogen 分泌に対する somatostatin の影響	-----	25
第1節 ラット胃内灌流法における pepsinogen 分泌に対する		
somatostatin の作用	-----	25
第2節 細胞内 Ca^{2+} に対する somatostatin の影響	-----	29
第3節 細胞内 cAMP に対する somatostatin の影響	-----	32
第4節 考察	-----	35

第3章	Pepsinogen 分泌に対する分泌促進物質間の相互作用	-----	38
第1節	培養ラット胃主細胞に対する pepsinogen 分泌促進物質の 組み合わせによる効果	-----	39
第2節	Second mediator の産生量に対する分泌促進物質の 組み合わせによる影響	-----	43
第3節	ラット胃内灌流法における secretin と各種分泌促進物質の 組み合わせによる酸及び pepsinogen 分泌の検討	-----	51
第4節	考察	-----	54
結論		-----	60
謝辞		-----	63
実験の部		-----	64
引用文献		-----	72

総論の部

緒言

胃潰瘍は攻撃因子と防御因子のバランスの破綻により発症すると言われている。このバランス説が1953年、Shay 等により提唱されて以来¹⁾、胃潰瘍の治療はこのバランスを如何に保つようにするか、ということを中心に行われてきた。特に、当時より "no acid, no ulcer" と言われてきた様に、攻撃因子の一つである酸を如何に抑えるかが、研究の焦点とされてきた。そのため、中和剤、抗コリン剤、 H_2 ブロッカー、さらには H^+, K^+ -ATPase 阻害剤（プロトンポンプインヒビター）といった酸分泌抑制剤が開発されてきた。最近の研究の発展に伴い、抗潰瘍薬の作用の研究は個体に対する効果ばかりでなく、作用機序が明確にされる方向へ進み、酸を分泌する壁細胞が用いられるようになってきた。1978年には Soll 等が酵素的消化や化学的、機械的操作等により胃粘膜から得た遊離壁細胞を用い、壁細胞膜上には生理的酸分泌刺激物質の histamine, gastrin 及び acetylcholine 受容体がそれぞれ独立して存在し、酸分泌はそれぞれの受容体を介することを確認した²⁾。一方、もう一つの攻撃因子である pepsin においては潰瘍発症における関与が明確でなく酸分泌より重要性が低いという理由で研究が遅れていた。当初、*in vitro* での pepsinogen 分泌の研究は組織培養法^{3,4)}や胃腺⁵⁻⁸⁾を用いて行われていたが、1982年 Ayalon 等によりイヌ胃粘膜から主細胞が単離され⁹⁾、続いて 1984年には Raufman 等によりモルモット胃粘膜から主細胞が単離され¹⁰⁾、以来、ここ10年の間に様々な研究がなされ、pepsinogen 分泌を調節する受容体と signal-transduction 機構についての多くの結果が得られてきた¹¹⁾。

そもそも胃は粘膜層と結合組織である粘膜下層及び筋層から成り、胃の内腔に面する粘膜表面は単層の表面粘液細胞によって構成されそれらの分泌する粘液に覆われている。表面粘液は分泌された胃液と上皮細胞の直接的な接触を妨げ、胃粘膜の保護に不可欠の存在である。胃の体部と底部の粘膜には胃液を分泌する胃

腺腔が開口しており、腺腔の入口から少し中に入ったところには粘液を分泌し幹細胞的な性格を示すといわれる粘液頸部細胞、また腺腔の深部には胃酸を分泌する壁細胞と pepsinogen を分泌する主細胞が存在する。Pepsinogen は主細胞にチモーゲン顆粒として蓄積されており刺激により腺腔に分泌され、さらに壁細胞から分泌された酸によりタンパク分解能を有する pepsin に活性化され、酸と共に胃内腔へ流れだし食物の消化を行う。

これまで主細胞を用いた pepsinogen 分泌の研究の多くはモルモットやイヌ等の動物を用いておりラット主細胞を用いた研究がほとんど行われていなかった。その理由としては、ラットの胃粘膜では遊離細胞の調製方法の確立が未だ行われていなかったことにより実験に十分な細胞数の確保が難しいこと等が考えられる。著者は pepsin が胃、十二指腸潰瘍発症の補助因子であると言われていることから、pepsinogen 分泌機序解明の基礎的検討を目的とした。そのことにより、酸分泌、潰瘍実験モデル、抗潰瘍剤試験、等 *in vivo* 実験の多くは主にラットが用いられているということからも、ラット主細胞からの pepsinogen 分泌を研究することにより、これまで報告されたラットを用いた酸分泌研究や *in vivo* 実験と直接比較することが可能となる。また、pepsinogen 分泌の促進や抑制についての機序を解明し、さらに消化における種々の消化管ホルモンの働きについて考察し、消化性潰瘍治療に役立てることを目的とした。

そこで著者は調製したラット胃粘膜遊離細胞から主細胞を分離し、それらを用いて pepsinogen 分泌実験系の確立を行い、各種分泌促進物質による pepsinogen 分泌とその second mediator の検討をした。さらに、vitamin B₁₂ binding glycoprotein である intrinsic factor (IF) はラットにおいては主細胞に存在することから、その分泌の基礎的検討を行った（第1章）。次に、酸及び pepsinogen 分泌抑制因子として知られている somatostatin の抑制機構について検討（第2章）し、さらに、pepsinogen 分泌に対する分泌促進剤間の相互作用について（第3章）*in vivo* 実験と比較しながら検討を行った。

第1章 胃粘膜主細胞の単離と pepsinogen 及び intrinsic factor の分泌に関する基礎的検討

In vivo における pepsinogen 分泌実験に際し大きな障害となるものは主細胞以外の壁細胞、粘液細胞、内分泌細胞等からの分泌の影響、神経やホルモンの相互作用、さらには動物の個体差や胃腺腔の中に溜まっている pepsinogen が酸分泌に伴って流れ出す "wash out" 現象などである。従って、これらの問題を回避する方法は主細胞を単離して実験することである。このことにより各種分泌促進物質の主細胞における受容体、pepsinogen 分泌の second mediator 及びその機序を他の細胞や生理活性物質の影響を受けずに直接解明できる利点がある。

単離主細胞を用いた研究は elutriation (対交流遠心法) によってイヌの胃粘膜遊離細胞から分離し単層培養したのが最初である⁹⁾。後に、モルモット胃を用いて Percoll 密度勾配遠心法で胃粘膜遊離細胞から主細胞が分離された¹⁰⁾。この方法は比較的容易に主細胞を調製できるため多くの研究室において pepsinogen 分泌の研究に用いられている。しかし、酸分泌、潰瘍実験モデル、抗潰瘍剤試験等 *in vivo* 実験の多くは主にラットが用いられているにもかかわらず、これまでラット主細胞を用いた報告がないのはラット胃粘膜からの主細胞の調整が困難であったからと思われる。そこで著者はラットを用い胃粘膜遊離細胞からの主細胞の分離法の確立を試みた。調製した主細胞はそのままの状態でも分泌促進物質に対し pepsinogen 分泌反応を示したがバラツキが大きく安定した値が得られなかった。そこで単層培養を試み安定した分泌能を持つ主細胞が得られたので、これを用いて pepsinogen 分泌の実験を行った。さらに、遊離主細胞を用い各種分泌促進物質の mediator である細胞内 Ca^{2+} と cAMP に対する効果について検討した。

内因子 (Intrinsic Factor, IF) は、外科的手術による胃切除者や固有胃腺の萎縮による萎縮性胃炎患者に多発する悪性貧血が胃粘膜抽出物の投与により改善されることから存在が推察されていた。その後の研究により IF は vitamin B₁₂

(V.B₁₂) binding glycoprotein として V.B₁₂ の吸収担体であることが明らかにされ¹²⁾、1988 年には Dieckgraefe 等によりラット IF の一次構造が決定された¹³⁾。そもそも V.B₁₂ は活性のある cobalamin (Cbl) 誘導体の総称で、食物中の V.B₁₂ はまず唾液中の Cbl binding protein である R 因子と結合し、胃を経て腸へと運ばれ、腸でタンパク分解酵素により R 因子が消化されると胃粘膜から分泌された IF と結合し、回腸にある V.B₁₂ 吸収部位まで運ばれる¹⁴⁾。この様に IF は V.B₁₂ の吸収に重要な役割を果たしている。しかし、糖鎖構造や V.B₁₂ との結合様式、吸収過程等は未知な部分が多く、特に、胃粘膜からの分泌に関する研究は遅れている。一般に、IF はヒト¹⁵⁾、イヌ¹⁶⁾、ウサギやモルモット¹⁷⁾等多くの哺乳類では壁細胞から分泌され、ラットやマウスにおいては壁細胞よりはむしろ主細胞に多く存在していると言われている¹⁶⁾。著者は IF の測定系を確立するとともに主細胞からの IF 分泌を *in vivo* 及び *in vitro* で pepsinogen 分泌と比較しながら検討した。

第 1 節 胃粘膜遊離細胞からの主細胞の分離

ラット胃粘膜からの遊離主細胞の調製法は次のように順次検討を行った。遊離細胞を調製するときに用いた酵素としては遊離後最も反応性が維持されていた Disperse I 1000 U/ml を用い、消化を行った。消化後、ピペットによる剥離操作を行い胃粘膜遊離細胞を調製した（基本的な操作は実験の部を参照）。ここで得られた胃粘膜遊離細胞から次のように主細胞の分離を行った。Percoll 溶液を 60 %、40 %、20 % に調製し、不連続密度勾配を作製し、胃粘膜遊離細胞をその上に重層して 1200 × g で遠心を行った (Fig. 1)。PAS 染色、免疫染色から 40 % と 60 % 境界、底の分画にはそれぞれ主細胞が約 70 %、83 % 含有されていた。しかし、得られる細胞数が非常に少なく、また分画細胞を上から順に採取するために分画ごとの細胞が採り切れなかった。さらに、Percoll 20 % と

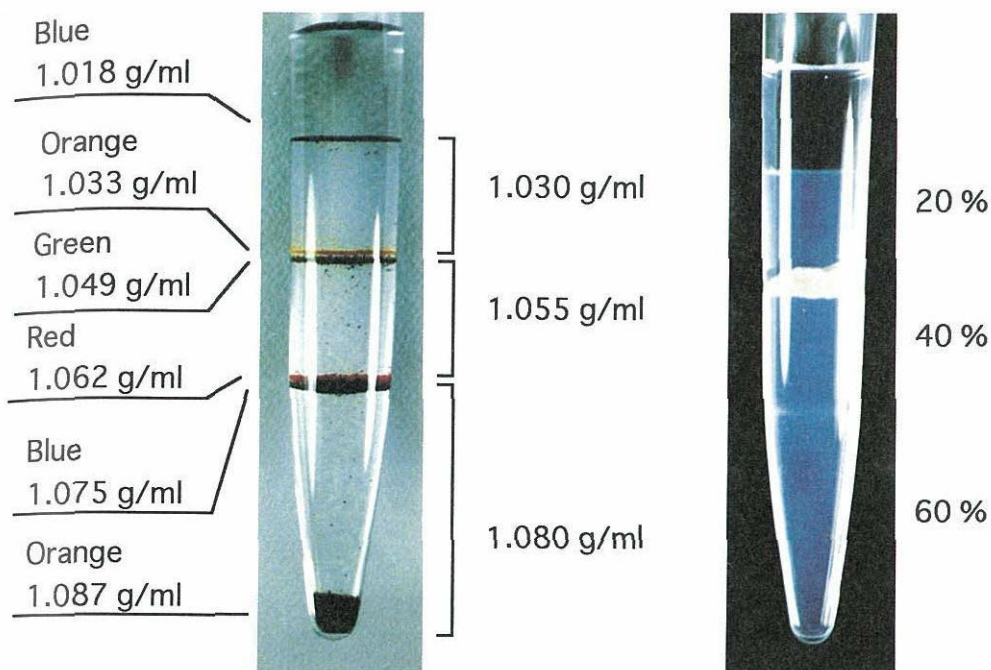
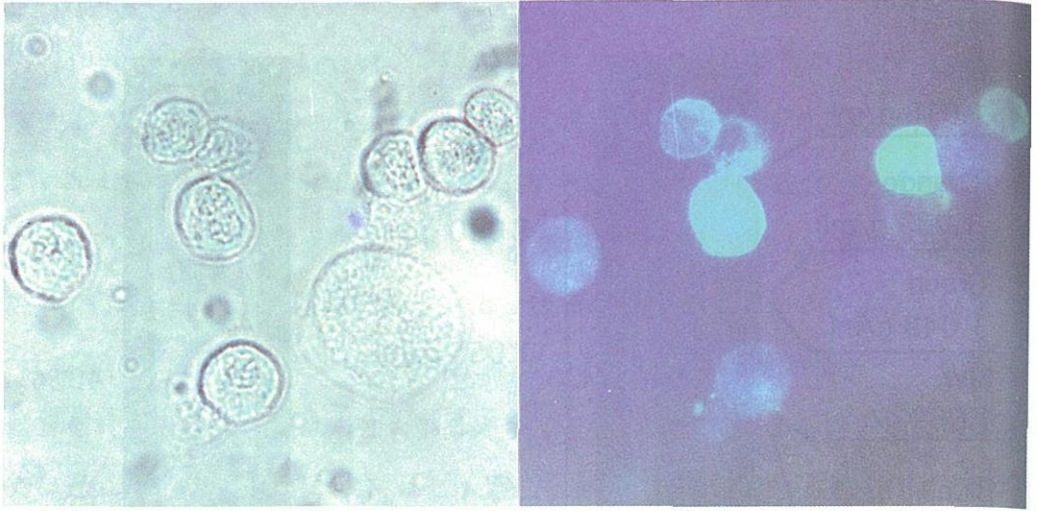


Fig. 1. Separated Rat Gastric Mucosal Cells by Percoll Gradient Centrifugation

Gastric mucosal cells and density marker beads were poured onto Percoll solution, and centrifuged at $1200 \times g$ for 5 min.

40 % 境界に粘液と細胞が絡み合った状態の層が形成され細胞の沈降が妨げられていた。これらの問題点を解決するために様々な検討を重ね、粘液と細胞が絡み合った層の形成を阻止するために 45 % Percoll 溶液の上に 30 % Percoll で胃粘膜遊離細胞懸濁液としたものを重層し遠心分離を行った。45 % Percoll に対して沈殿した細胞分画について、抗 pepsinogen 抗体による免疫染色を行った結果、80 % 以上 ($83.43 \pm 1.91 \% n=4$) が主細胞であった (Fig. 2) ので、以下、この分画を主細胞分画とした。細胞の生存率は trypan blue 排除テストによって確認し、常に 90 % 以上であった。得られた主細胞を培養し、培養された細胞の 90 % 以上は免疫染色陽性細胞であった (Fig. 3) ので pepsinogen 分泌の実験に供した。

Mucosal cells



Fractionated Chief Cells

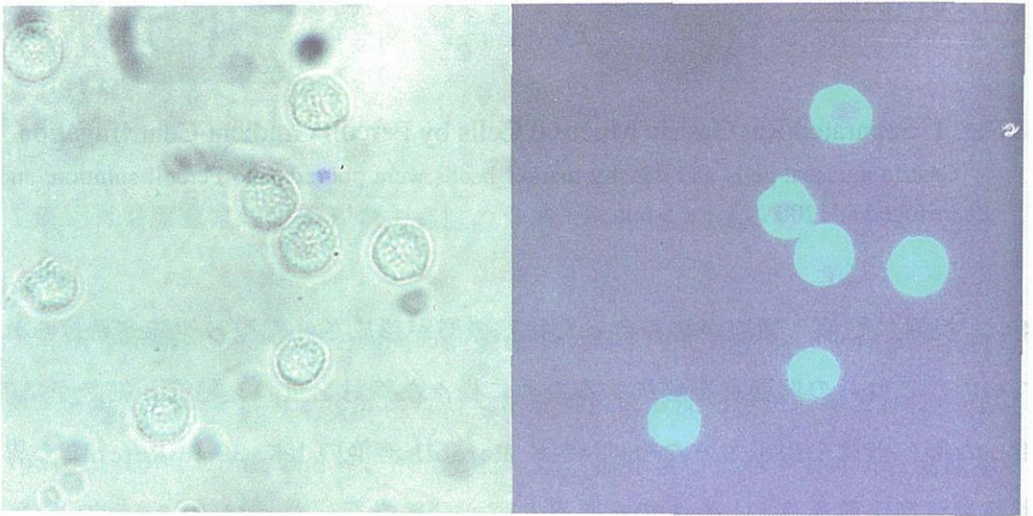


Fig. 2. Immunofluorescent Staining of Gastric Mucosal Cells and Fractionated Chief Cells Using Pepsinogen Antibody

After fixation with 10 % formalin, the cells were incubated with diluted rabbit anti-pepsinogen antiserum (1:1000) in phosphate buffered saline (pH 7.4) containing 0.3 % Triton X-100 at 4 °C for 24 h. They were then incubated with FITC-conjugated goat antirabbit IgG (1:100) in phosphate buffered saline (pH 7.4) containing 0.3 % Triton X-100 at 37 °C for 30 min.

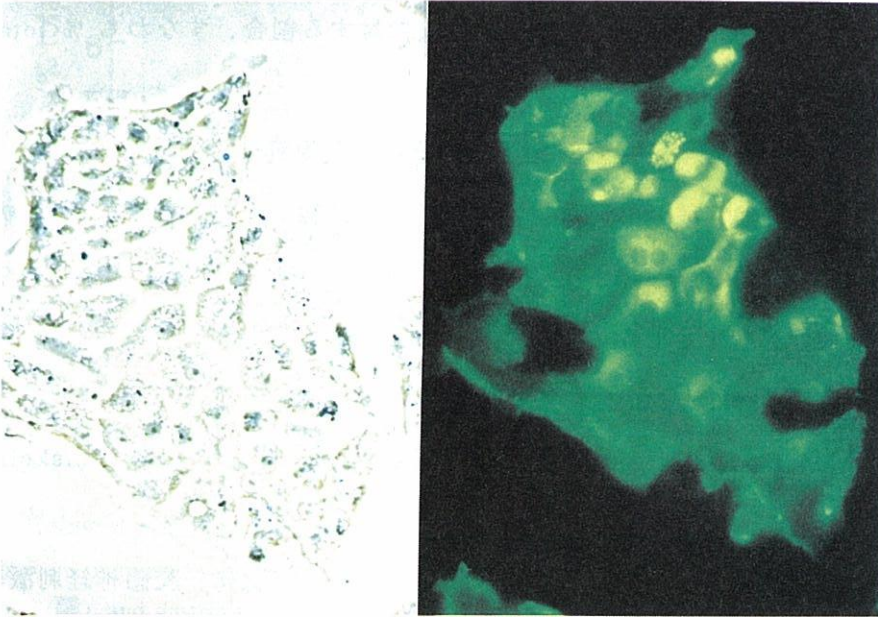


Fig. 3. Immunohistochemical Staining of Cultured Chief Cells

After fixation with 10 % formalin, the cells were incubated with diluted rabbit anti-pepsinogen antiserum (1:1000) in phosphate buffered saline (pH 7.4) containing 0.3 % Triton X-100 at 4 °C for 24 h. They were then incubated with FITC-conjugated goat antirabbit IgG (1:100) in phosphate buffered saline (pH 7.4) containing 0.3 % Triton X-100 at 37 °C for 30 min.

第2節 培養ラット胃主細胞からの pepsinogen 分泌に対する分泌促進物質の影響

Pepsinogen の定量は、精製した pepsinogen を用い作製した抗 pepsinogen 抗体を用い avidin-biotin complex enzyme linked immunosorbent assay (abcELISA) 系を確立して定量した。定量範囲は $0.3 \sim 5 \times 10^{-9}$ g/100 μ l であり、主細胞 1 個あたりに約 2×10^{-11} g の pepsinogen が含有されていることから、分離された主細胞の数が少なくても十分に実験が行える測定系である。Pepsinogen 分泌は反応後、medium を分取し、細胞を凍結融解して細胞に含有

されている総 pepsinogen 量を求めその量に対する割合、すなわち % total で表示した。

第 1 節で確立した培養主細胞を用いて分泌刺激物質に対する pepsinogen 分泌の経時的な反応と各種分泌促進物質の用量反応曲線を Fig. 4 と 5 に示した。反応開始後の経時的な pepsinogen 分泌は control の基礎分泌量との差から 30 min で最大分泌量を示したので、以後、反応時間を 30 min と設定した。各種分泌促進物質の pepsinogen 分泌に対する影響を検討すると、carbachol は 1×10^{-7} M、CCK-8 は 1×10^{-10} M、secretin は 1×10^{-10} M、forskolin は 1×10^{-5} M から濃度依存的に有意に pepsinogen 分泌を刺激した。しかし、histamine と gastrin による反応はわずかであった。次に、交感神経刺激薬について検討した (Fig. 6)。生体物質である epinephrine, norepinephrine, α 受容体刺激薬の phenylephrine, β 受容体刺激薬の isoproterenol などの刺激による pepsinogen 分泌は、有意差はあるものの弱い反応しか示さなかった。

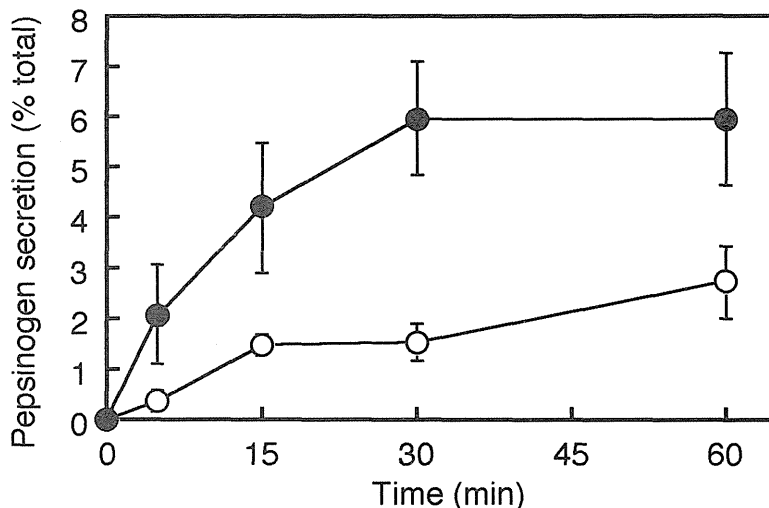


Fig. 4. Time Courses of Carbachol-Induced Pepsinogen Secretion from Cultured Chief Cells

Cultured cells were incubated with vehicle (○) or carbachol (1×10^{-4} M) (●) for 5, 15, 30 and 60 min at 37 °C. Each value is the mean \pm S.E. of five separate experiments.

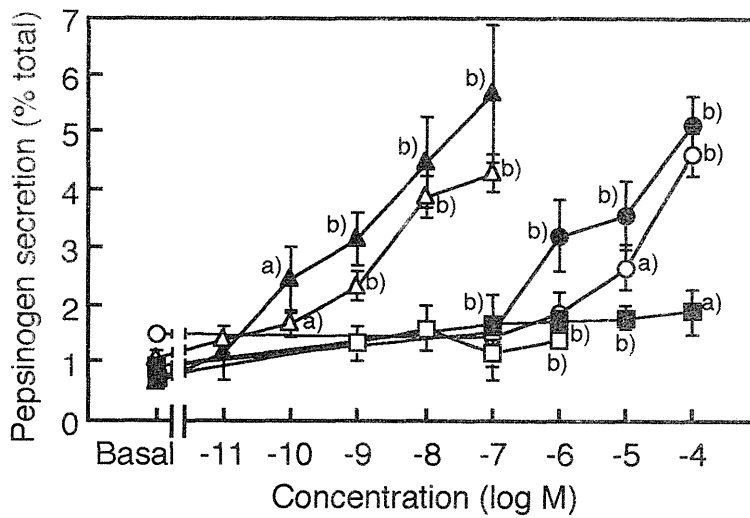


Fig. 5. Effects of Secretagogues on Pepsinogen Secretion from Chief Cells

Cells were incubated with carbachol (●), CCK-8 (▲), forskolin (○), secretin (△), histamine (■), and gastrin (□) for 30 min at 37 °C, and then pepsinogen in a medium was measured by ELISA. Each value is the mean \pm S.E. of five separate experiments.

a) $p < 0.05$, b) $p < 0.01$.

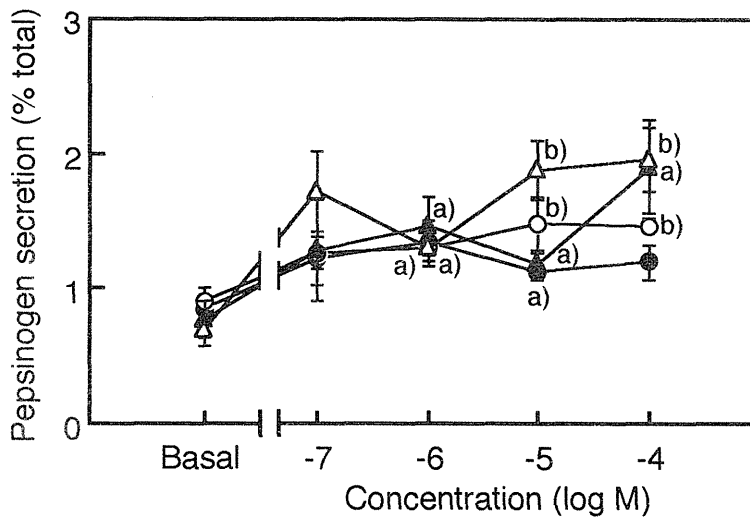


Fig. 6. Effects of Adrenergic Reagents on Pepsinogen Secretion from Chief Cells

Cells were incubated with epinephrine (●), norepinephrine (○), phenylephrine (▲), isoproterenol (△), for 30 min at 37 °C, and then pepsinogen in a medium was measured by ELISA. Each value is the mean \pm S.E. of five separate experiments. a) $p < 0.05$, b) $p < 0.01$.

第3節 ラット胃主細胞における各種分泌促進物質による細胞内 Ca^{2+} の変化

Fura-2 は細胞内遊離 Ca^{2+} を測定する試薬で、 Ca^{2+} とキレートを作ると蛍光特性が変化し、励起光 340 nm と 380 nm による蛍光比をとった値は Ca^{2+} 量と比例して上昇することがわかっている。様々な細胞がある刺激を受けた際に細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇する現象が知られている。そこで、分離された主細胞に fura-2 を負荷した後、種々の分泌促進物質に対する細胞内 Ca^{2+} の影響について検討した (Fig. 7)。Carbachol (1×10^{-5} M) 及び CCK-8 (1×10^{-9} M) は明瞭な主細胞の細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を引き起こした。その上昇は約 20 sec でピークに達した後、徐々に減少したが、基底値までは戻らなかった。また、medium 中に Ca^{2+} を含まない溶液 (1 mM EGTA を含む) においても carbachol と CCK-8 は細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を引き起こした。Pepsinogen 分泌においても medium 中に Ca^{2+} がなくても carbachol (1×10^{-5} M) 及び CCK-8 (1×10^{-9} M) 刺激により、 Ca^{2+} 存在下の場合と比較して弱いが明らかに分泌した (Table 1)。しかし、histamine (1×10^{-4} M)、gastrin I (1×10^{-7} M) 及び secretin (1×10^{-8} M) の刺激では細胞内 Ca^{2+} 濃度に変化を及ぼさなかった。Carbachol や CCK-8 による刺激に対して、培養した主細胞からの pepsinogen

Table 1. Effects of Carbachol- and CCK-8-Induced Pepsinogen Secretion from Chief Cells in the Medium with or without Ca^{2+}

Secretagogues	Pepsinogen secretion	
	1 mM Ca^{2+}	0 mM Ca^{2+}
None	1.01 ± 0.08	0.78 ± 0.05
Carbachol (1×10^{-5} M)	3.48 ± 0.14	2.38 ± 0.21
CCK-8 (1×10^{-9} M)	3.66 ± 0.32	2.64 ± 0.17

Each value is the mean \pm S.E. from four separate experiments.

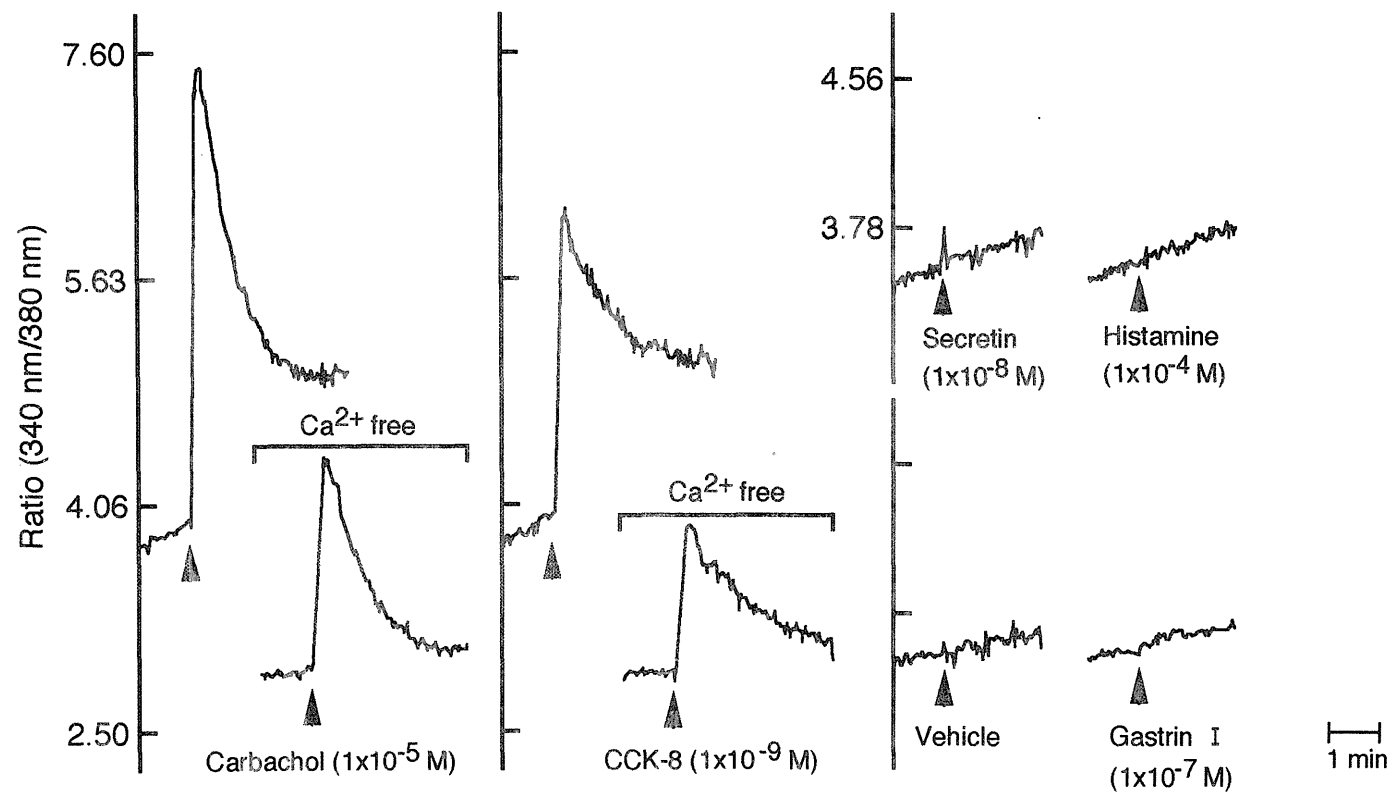


Fig. 7. Effects of Secretagogues on Cytosolic Free Ca^{2+} Concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) in Chief Cells

Fluorescence of fura-2 loaded cells (2×10^6 cells/ml) at 500 nm was measured by excitation at 340 and 380 nm alternately. The fluorescence changes induced by carbachol and CCK-8 were measured in medium with or without Ca^{2+} .

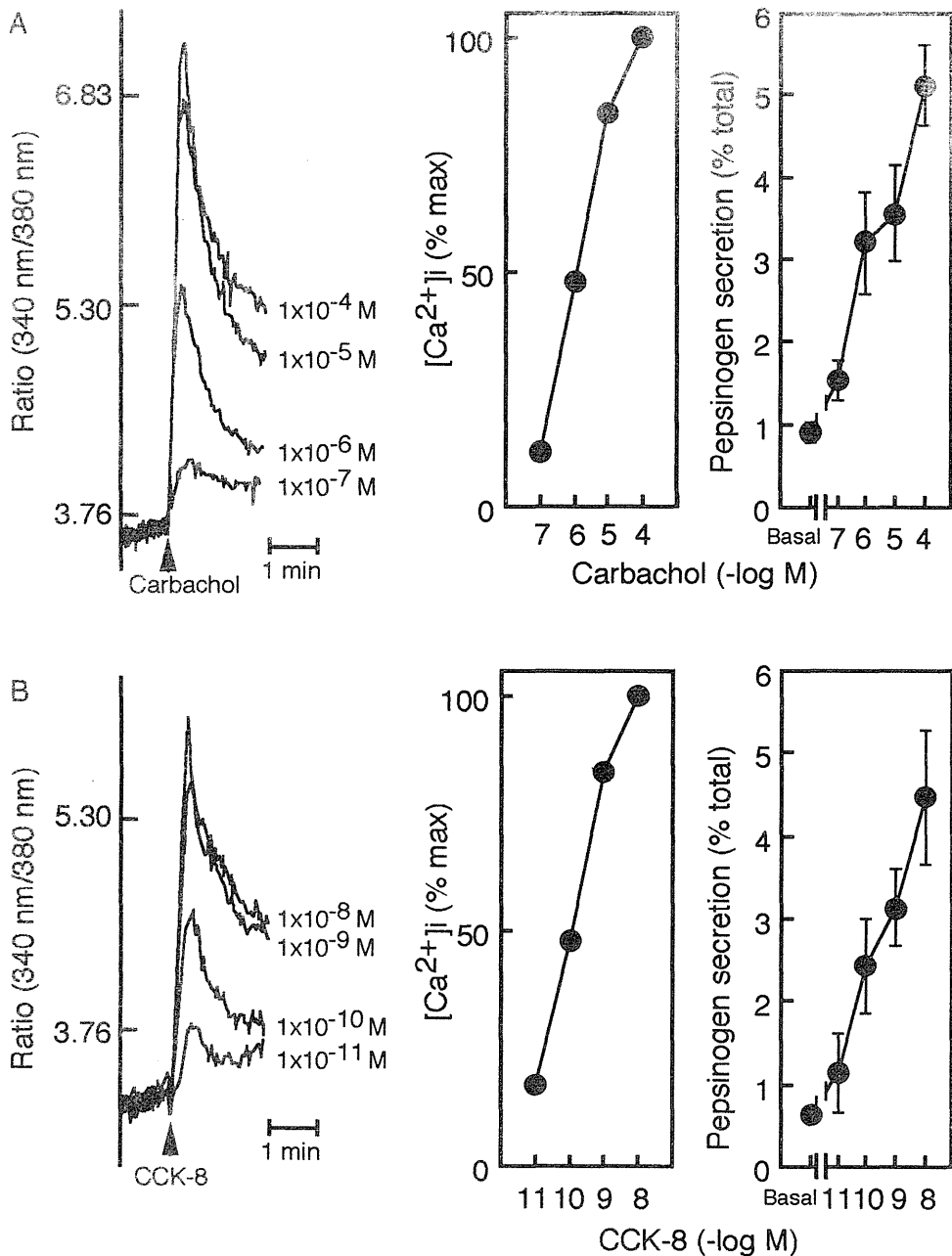


Fig. 8. Dose-Response Curves of $[Ca^{2+}]_i$ Increase and Pepsinogen Secretion Induced by Carbachol (A) and CCK-8 (B)

Maximum responses in $[Ca^{2+}]_i$ increase were obtained with a concentration of 1×10^{-4} M carbachol or 1×10^{-8} M CCK-8. $[Ca^{2+}]_i$ increase is expressed as percentage of the maximum response. For the measurement of pepsinogen secretion, cells were incubated with carbachol or CCK-8 for 30 min and separated from a medium by decantation and centrifugation. Each value of pepsinogen secretion is the mean \pm S.E. from five separate experiments.

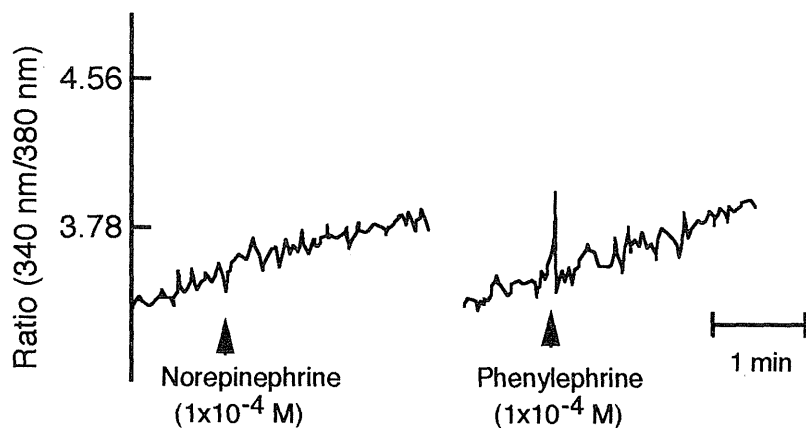


Fig. 9. Effects of Norepinephrine and Phenylephrine on $[Ca^{2+}]_i$ Increase

After cells were loaded with fura-2, the changes of fluorescence ratio (340 nm/380 nm) in chief cells induced by norepinephrine or phenylephrine were measured.

分泌と調製後すぐの主細胞の細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇との比較を Fig. 8 に示した。Pepsinogen 分泌及び細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇 とともに carbachol は 1×10^{-7} M, CCK-8 は 1×10^{-11} M から濃度依存的に促進し、両反応の間には相関性が認められた。交感神経刺激薬の norepinephrine や α 受容体刺激薬の phenylephrine による刺激では細胞内 Ca^{2+} 濃度に変化を及ぼさなかった (Fig. 9)。

第4節 ラット胃主細胞における各種分泌促進物質の細胞内 cAMP 産生に対する作用

主細胞の cAMP 産生に対する各種分泌刺激物質の効果を検討する前に、実験条件を検討した。調製した主細胞 2×10^6 個を用い、分泌刺激物質として secretin と cyclic nucleotide phosphodiesterase 阻害剤の 3-isobutyl-1-methyl xanthine (IBMX) を用い、37 °C で経時的に cAMP の産生量を定量した (Fig. 10)。Secretin 及び IBMX のそれぞれ単独刺激では対照の vehicle と

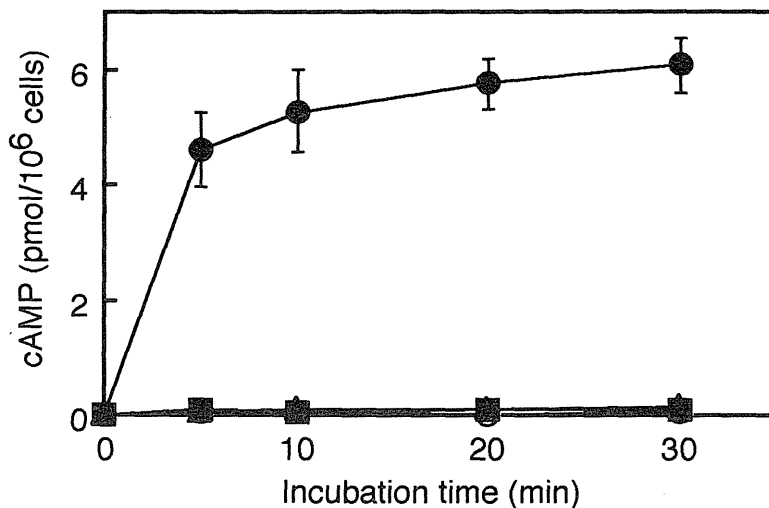


Fig. 10. Time Courses of cAMP Accumulation Induced by Secretin and/or IBMX in Chief Cells

Cells (2×10^6 cells/ml) were incubated with vehicle (○), IBMX (1×10^{-4} M) (▲), secretin (1×10^{-8} M) (■), or IBMX (1×10^{-4} M) plus secretin (1×10^{-8} M) (●) for 5, 10, 20 and 30 min at 37 °C. Cellular cAMP was measured by the method in this text. Each value is the mean \pm S.E. of three separate experiments.

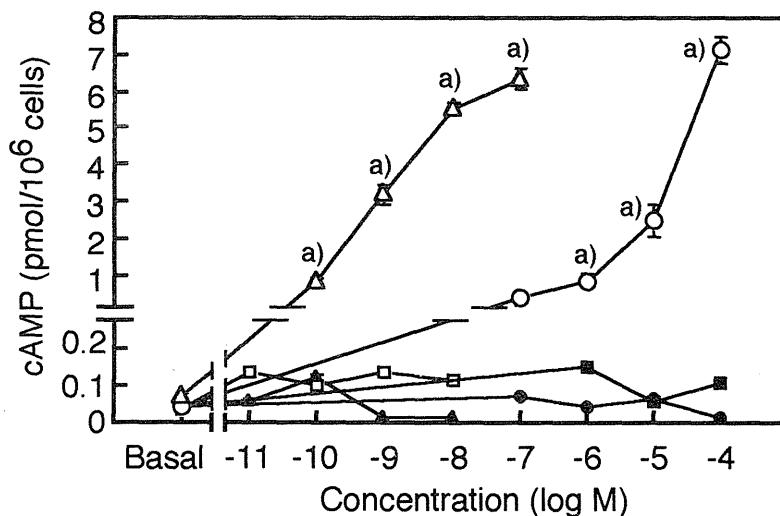


Fig. 11. Effects of Secretagogues on cAMP Production in Chief Cells

Cells were incubated with carbachol (●), CCK-8 (▲), forskolin (○), secretin (△), histamine (■) and gastrin (□) for 10 min at 37 °C in the presence of IBMX (1×10^{-4} M). Each value is the mean \pm S.E. of four separate experiments. a) $p < 0.01$.

同じく、cAMP の蓄積は認められなかった。しかし、IBMX 存在下で secretin による刺激を行うと 5 min 以内に急速な蓄積が認められ、10 min 以降も緩やかな増加を示した。そこで以後、実験条件を IBMX 1×10^{-4} M 存在下 37 °C で 10 min と設定した。

調製した主細胞の cAMP 産生に対する各種分泌促進物質の用量反応曲線を Fig. 11 に示す。Secretin と forskolin はそれぞれ 1×10^{-10} M, 1×10^{-6} M より濃度依存的に cAMP の産生を促進した。Secretin と forskolin による cAMP の産生と培養した主細胞からの pepsinogen 分泌 (Fig. 5) との間には相関性が認められた。一方、carbachol, CCK-8, histamine 及び gastrin は主細胞の cAMP 産生を刺激しなかった。次に、交感神経刺激薬についての結果を Fig. 12 に示す。

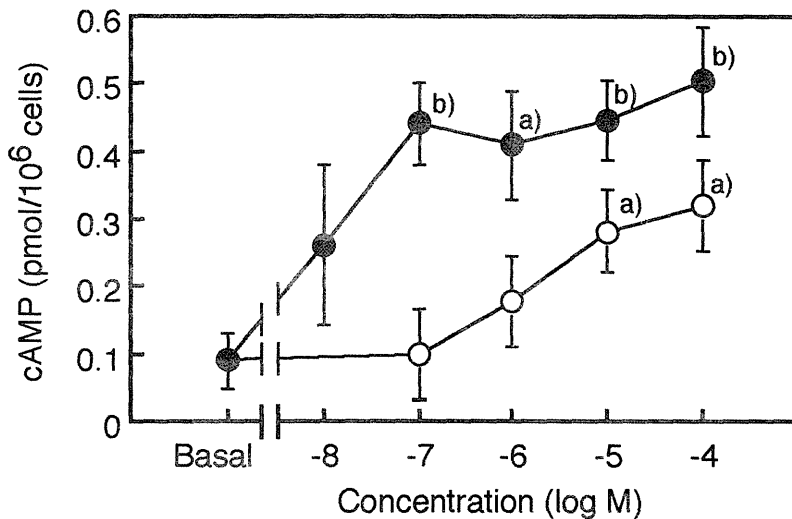


Fig. 12. Effects of Norepinephrine and Isoproterenol on cAMP Production in Chief Cells

Cells were incubated with norepinephrine (○) and isoproterenol (●) for 10 min at 37 °C in the presence of IBMX (1×10^{-4} M). Each value is the mean \pm S.E. of four separate experiments. a) $p < 0.05$, b) $p < 0.01$.

Norepinephrine と β 受容体刺激薬の isoproterenol の刺激はそれぞれ 1×10^{-5} M, 1×10^{-7} M より濃度依存的に cAMP の産生を促進した。しかし、その増加は secretin や forskolin による cAMP の産生と比較し、非常に低く isoproterenol による cAMP の産生は secretin による最大反応の 1/10 以下、norepinephrine にいたっては 1/20 以下であった。

第5節 ラット胃主細胞からの intrinsic factor 分泌の検討

Cbl-binding protein 分泌における胃酸及び pepsinogen 分泌促進物質による作用をラット胃内灌流法を用いて *in vivo* で検討した (Fig. 13)。Cbl-binding protein は ^{14}C で標識した $^{14}\text{CN-Cbl}$ を用いた cobalamin-binding protein capacity assay (CBPCA) にて測定し、Cbl-binding protein が 1 ng の Cbl と結合する量を 1 Unit として表示した。各刺激物質は1回目投与後、2時間の間隔を置いて2回目の投与を行った。Cbl-binding protein と pepsinogen の分泌は1回目、2回目投与共に carbachol 及び CCK-8 によって同様のパターンで刺激された。しかし、histamine 及び tetragastrin 投与では両方ともわずかしかな分泌されなかった。特に、histamine 及び tetragastrin 2回目投与においては IF 分泌はほとんど認められなかった。

次に、主細胞からの IF 分泌について検討を試みたが、培養細胞からの IF 分泌は微量であったため、CBPCA では測定することができなかった。そこで、著者は IF に対する抗体を作製し abcELISA を確立して微量定量を可能にした。作製した IF 抗体を用いて培養主細胞の免疫染色を行った結果、染色の強さに違いがあるが、ほとんどの細胞が陽性を示した (Fig. 14)。さらに、IF の abcELISA と CBPCA を用いて幾つかの組織と血清中の IF と Cbl-binding protein の含量を定量した。その結果を Table 2 に示す。Cbl-binding protein は顎下腺と胃に多く含まれているが、IF 含量は胃が最も高い値を示し、顎下腺

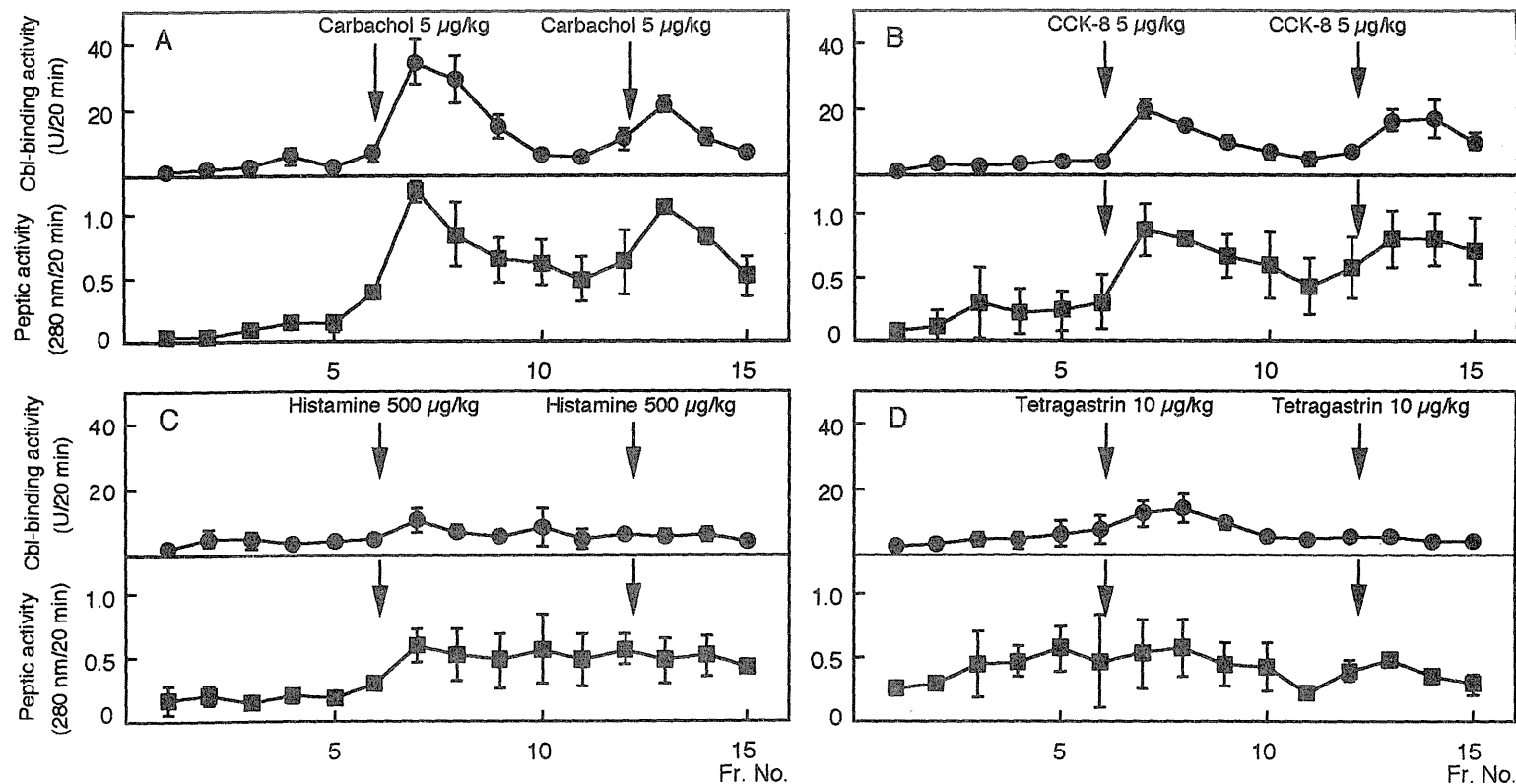


Fig. 13. Effects of Carbachol, CCK-8, Histamine and Tetragastrin on IF and Pepsinogen Secretion in Rat Gastric Perfusion

Isotonic phosphate buffer (pH 6.8) was perfused at the rate of 0.05 ml/min, and a perfusate was collected every 20 min. The indicated doses of chemicals (A, carbachol 5 $\mu\text{g/kg}$; B, CCK-8 5 $\mu\text{g/kg}$; C, histamine 500 $\mu\text{g/kg}$; D, tetragastrin 10 $\mu\text{g/kg}$) were injected intravenously at the arrows. Each value is the mean \pm S.E. of three experiments.

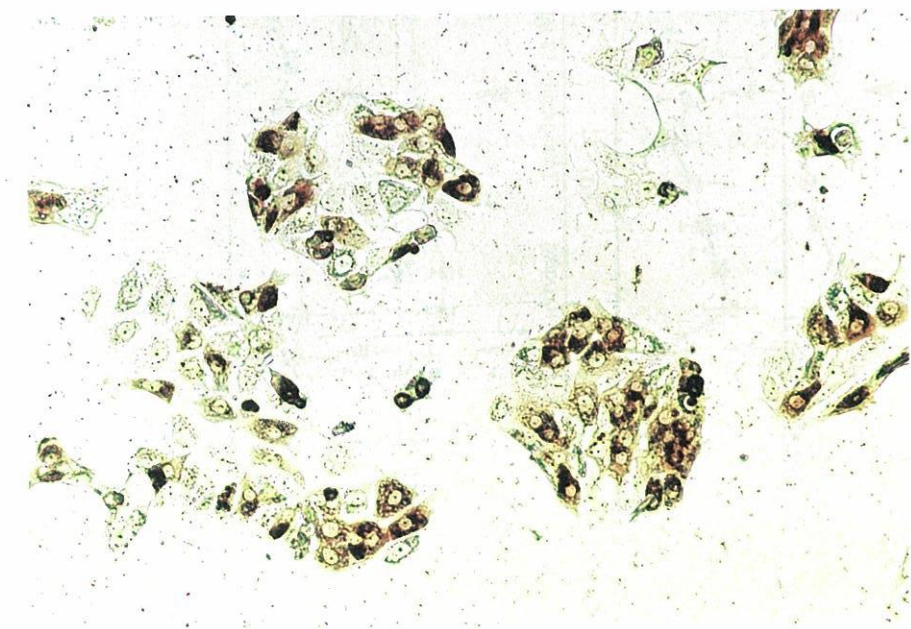


Fig. 14. Immunohistochemical Study of IF in Cultured Chief Cells

After fixation with 10 % formalin, the cells were incubated with diluted rabbit anti-IF antiserum (1:100) at 4 °C for 18 h. They were then incubated with biotinylated goat anti-rabbit IgG antibody at 37 °C for 30 min, then with the avidin-conjugated peroxidase at 37 °C for 30 min. The color was developed with 3-amino-9-ethylcarbazole in 50 mM acetate buffer (pH 5.0). (× 200).

では測定限界以下であった。培養したラット主細胞からの IF 分泌に対する各種分泌促進物質の作用を Fig. 15 に示す。Carchol は 1×10^{-5} M、CCK-8 は 1×10^{-9} M、secretin は 1×10^{-10} M より、それぞれ IF 分泌を濃度依存的に刺激した。しかし、histamine と tetragastrin は胃酸分泌促進に十分な濃度においても pepsinogen の場合と同様 IF 分泌を促進しなかった。Ca²⁺ ionophore である A23187 と adenylate cyclase の活性化剤である forskolin は濃度依存的に IF 分泌を強く刺激した。

Table 2. Contents of IF and Cbl-Binding Protein in Some Tissues and Serum

Tissue	IF ($\times 10^{-4}$ g/g tissue)	Cbl-binding protein (U/g tissue)
Submaxillary gland	0.004 ± 0.000	1.710 ± 0.262
Stomach (corpus)	6.353 ± 1.424	1.502 ± 0.157
Liver	2.372 ± 0.514	0.168 ± 0.043
Spleen	0.078 ± 0.013	0.156 ± 0.054
Kidney	0.599 ± 0.193	0.073 ± 0.009
Serum	0.413 ± 0.063	0.081 ± 0.014

Each value is the mean \pm S.E. of three experiments.

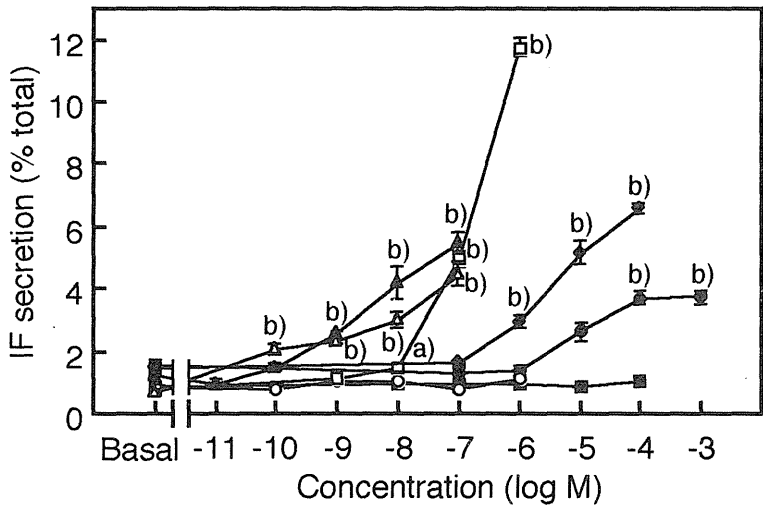


Fig. 15. Dose-Response Curves for the Effects of Some Secretagogues of IF Secretion from Cultured Chief Cells

Cells were incubated with some secretagogues for 1 h at 37 °C. IF secretion is expressed as % of total IF that was estimated after freezing and thawing of cultured chief cells. Each value is the mean \pm S.E. of four separate experiments.

Symbols: ●, carbachol; ■, histamine; ▲, CCK-8; ○, tetragastrin; □, A23187; △, secretin; ◆, forskolin. a) $p < 0.05$, b) $p < 0.01$.

第 6 節 考察

ラット胃粘膜から遊離主細胞を調製する際の問題点は如何にして機能を維持した細胞を、実験に十分な数だけ確保することができるかにある。他の研究者等による遊離細胞の調製法は胃粘膜を細切し collagenase や Ca^{2+} キレート剤により処理を行い、ピペットにより分散するという比較的容易な方法であった^{10,18)}。しかし、この一連の操作ではラット胃粘膜から機能を保持した主細胞を十分量調製することはできなかった。そこで、摘出した胃を反転し酵素処理をするという Lewin 等の壁細胞の調製法¹⁹⁾を基に著者はラット胃からの遊離細胞調製法を確立した²⁰⁾。また、消化用の酵素に Dispace I を用いたことで高い機能を維持した細胞を得ることができた。この様に主細胞の分離を汎用される試薬や機器を使用し容易に行うことを可能とした。ラット主細胞を用いた実験法の確立は、酸分泌実験、抗潰瘍剤試験、実験潰瘍モデル、など *in vivo* 実験のほとんどが主にラットを用いているということから切望されていた。このことにより他の研究結果との比較が容易になり、またコストの面からも有利であり、主細胞培養系の確立は今後の pepsinogen 分泌や生合成さらに抗潰瘍薬研究の発展にも繋がるであろうと考えられる。

Carbachol, CCK-8 及び secretin は他の動物を用いた研究報告^{10,18,21)}と同様、種差に関係なくラット胃主細胞においても pepsinogen 分泌を強く引き起こす生理活性物質である。しかし、histamine 及び gastrin はラット主細胞から pepsinogen 分泌をほとんど促進しなかった。Histamine はイヌやネコにおいて比較的低濃度で pepsinogen 分泌を刺激し、高濃度では分泌を抑制するとの報告があり²²⁾。また、イヌを用いた実験で高濃度の histamine は pepsinogen 分泌を減少させ、そしてコリン作動性薬物の刺激による pepsinogen 分泌を抑制することも報告されている²³⁾。また、無麻酔のネコを用いた実験では somatostatin は pentagastrin による pepsinogen 分泌を抑制するが、histamine による分泌に対

しては抑制しないという報告もある²⁴⁾。モルモットにおいても histamine は、わずかに分泌を刺激し、その second mediator は cAMP であると報告されており²¹⁾、種属間で一致した結果が得られていない。Gastrin は CCK-8 と C 末端 5 個のアミノ酸が同じペプチドであり、膵臓のような組織においてはこれらのペプチドは同じ受容体に結合することが報告されている²⁵⁾。しかし、主細胞においては gastrin と CCK-8 は別の受容体に結合すると考えられている²⁶⁻²⁸⁾。Gastrin の刺激はラットの場合と同様イヌ主細胞からの pepsinogen 分泌作用を示していないが¹⁸⁾、モルモット主細胞からは CCK-8 刺激の約 60 % の分泌が示され、種差があるものと考えられている²⁶⁾。さらに、gastrin と CCK-8 受容体はモルモット主細胞において放射性同位元素で標識された CCK-8 や gastrin を用いた受容体結合実験により別々の受容体であることが確認されている²⁷⁾。今回得られた実験では、gastrin により細胞内 Ca^{2+} も pepsinogen の分泌も全く反応していなかったため CCK 受容体と gastrin 受容体は全く異なっていると考えられ、また、gastrin 受容体が存在しない可能性も高い。

交感神経刺激薬による pepsinogen 分泌は副交感神経刺激薬の carbachol ほど強くないが、 β 受容体刺激薬の isoproterenol でわずかな分泌と cAMP の産生が観察された。ウサギ胃腺を用いた初期の研究において β 受容体刺激によって pepsinogen の分泌を促進するという報告もあるが^{6,7)}、他の動物ではラットでの結果と同様にわずかな分泌を示しているだけである¹⁸⁾。

細胞内情報伝達系のうち特に細胞内 Ca^{2+} の濃度変化については Tsien 等によって quin-2 や fura-2 などの蛍光 Ca^{2+} 指示薬が開発されて以来^{29,30)}、数多く研究が行われてきた³¹⁾。モルモット主細胞においても幾つかの研究が行われ、carbachol や CCK-8 による刺激により細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を伴うことが確認されてきた³²⁻³⁵⁾。ラット主細胞においても carbachol や CCK-8 は濃度依存的に細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇を引き起こし、その上昇は pepsinogen 分泌との間に相関性があった。またこれらの物質による細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇は medium 中の

Ca²⁺ の非存在下においても起こることから Ca²⁺ チャンネルを介した細胞外からの Ca²⁺ の流入だけでなく phospholipase C の活性化によりイノシトールリン脂質が代謝を受け、それによって inositol trisphosphate (IP₃) と diacylglycerol (DG) が産生され、その IP₃ が細胞内 Ca²⁺ 貯蔵部位から Ca²⁺ の放出を刺激したことが示唆された。DG に関しては protein kinase C を活性化し pepsinogen 分泌を刺激するといわれているが³⁵⁾、その働きに関する詳細なことは未だ確定されていない。細胞内 Ca²⁺ 濃度と fura-2 による蛍光比の関係は Grynkiewicz 等によって以下の式で表わされている³⁰⁾。[Ca²⁺]_i = (R-R_{min})/(R_{max}-R) × Kd × β (R; F340/F380, R_{min}; 細胞に 0.1 % Triton X-100 を加え細胞を壊したときの Ca²⁺ 濃度 0 の F340/F380, R_{max}; 十分な Ca²⁺ 濃度存在下の F340/F380, Kd; Ca²⁺ と fura-2 の解離定数 (37 °C の medium 中で 224 nM), β; Ca²⁺ 濃度 0 の F380 と十分な Ca²⁺ 濃度存在下の F380 の比)。しかし、この計算方法は fura-2 の漏出や退色の影響を無視できるが、fura-2 と fura-2-Ca の 2 種類の蛍光しか存在しないことを前提に成り立つ。そのため、算出された細胞内 Ca²⁺ 濃度は正確なものではないと言われているが、参考のためラット主細胞の細胞内 Ca²⁺ 濃度を算出すると定常状態で 100 ~ 150 nM、carbachol 1 × 10⁻⁴ M の最大刺激によるピーク時で 450 ~ 550 nM の範囲であった。これはモルモット³⁵⁾とは若干異なり定常状態ではモルモットの方が高くなっていたが、イヌ³⁶⁾やウサギ³⁷⁾の場合の濃度とほとんど同じであったので、今回の測定結果は概ね実際の値を正しく反映していると考えられる。

主細胞における他の細胞内刺激伝達物質として cAMP がある。主細胞で adenylate cyclase 系にリンクしている受容体は secretin, vasoactive intestinal polypeptide 及び prostaglandin 等であることがモルモット主細胞を用いた研究ですでに確認されている^{21,38)}。今回の実験でラット主細胞においても secretin は cAMP を介して pepsinogen を分泌することが確認された。さらに、secretin による cAMP 産生の用量反応曲線と pepsinogen 分泌のそれとの間に

は相関性があった。また、受容体刺激の対照として *adenylate cyclase* の直接的な活性化剤である *forskolin* を用いたときにも同じように相関性があった。これらのことから、*secretin* の *pepsinogen* 分泌に関する *second mediator* は *cAMP* と考えられる。しかし、*histamine* は壁細胞において *cAMP* の産生を介して酸を分泌するにもかかわらず、同じ胃液中に *pepsinogen* を分泌する主細胞には全く作用せず、酸と *pepsinogen* 分泌は全く異なった調節を受けていることが考えられる。またこのことから、逆に今回用いた主細胞分画のなかに壁細胞の混在がほとんどないことも示している。

交感神経刺激薬で β 受容体刺激薬の *isoproterenol* は有意に *cAMP* 産生を示したが、*secretin* や *forskolin* と比較し 1/10 以下の産生しか示さず *pepsinogen* 分泌量と考えあわせると生体における *pepsinogen* 分泌の調節因子としての役割はあまりないと考えられる。しかし、後に述べる相乗作用のことも考え合わせると、ストレスなどの特殊な条件下では高い分泌を起こす可能性もあり、今後の研究を待ちたい。

胃から分泌されるものの一つに IF があるが、ラット胃主細胞からの IF 分泌に関する報告はない。著者はまず初めに胃内灌流法を用いて *Cbl-binding protein* 分泌を $^{14}\text{CN-Cbl}$ による *CBPCA* にて測定を行った。胃内灌流法では口から挿入したカテーテルを食道部で結紮しているため唾液中に存在する *Cbl* と結合する *R* 因子の混在はないものと考えられる。従って、*CBPCA* によって測定された *Cbl-binding protein* は IF であると考えてよい。*In vivo* での胃液分泌は多くの因子によって影響をうけるが同じ濃度の刺激物質を 2 度投与し、1 回目と 2 回目の反応がほぼ同じであればその反応は刺激物質に因るものと考えられる。IF と *pepsinogen* の分泌は *carbachol* と *CCK-8* によって 1 回目、2 回目ともに同じ程度の反応を示した。しかし、*histamine* と *tetragastrin* による刺激は酸分泌を十分に示す濃度にもかかわらず、2 回目の刺激では IF, *pepsinogen* 共に分泌を示さなかった。従って、1 回目の刺激によってわずかに認められた分泌は

酸分泌に伴った "wash out" であると考えられる。このことを更に詳細に検討するために培養細胞による検討を試みた。CBPCA は分離した主細胞からの IF 分泌を検討するには測定感度が悪く問題があった。そこで IF をアフィニティークロマトグラフィーにより胃粘膜から精製し、IF に対する抗体を作製し abcELISA を確立し、これにより定量を試みた結果、IF は 5×10^{-10} g/100 μ l まで測定可能となった。精製 IF は SDS-PAGE にて単一でラット IF 標準品と同一バンドであることが確認され、得られた抗体はラット IF 標準品、精製 IF、胃粘膜ホモジネートとのウエスタンブロットにより 57 kDa に単一の同一バンドを確認した³⁹⁾。主細胞中の IF 含量は pepsinogen 量の約 1/50 であった。そして、分子量から計算し 28.9 fmol/ 10^6 cells であり、ヒト胃粘膜遊離細胞の IF 含量が 28.4 fmol/ 10^6 cells であるとの報告⁴⁰⁾から哺乳類胃粘膜中の IF 含量はほとんど同じであろうと思われる。CBPCA によって測定された顎下腺中の Cbl-binding protein は IF の abcELISA による測定含量と大きく異なることから R 因子であると考えられる。IF の abcELISA による各組織の IF 含量は CBPCA の測定結果より全体的に高い値を示した。これは CBPCA ではすでに Cbl と結合している Cbl-binding protein は測定されないことによるからだと思われる。培養ラット胃主細胞からの IF 分泌は pepsinogen 分泌同様 carbachol, CCK-8 及び secretin によって刺激され、histamine や gastrin は IF 分泌を刺激しなかった。A23187 及び forskolin もまた IF 分泌を刺激したことや、第 3, 4 節で示した各種分泌促進物質に対する主細胞内 Ca^{2+} , cAMP の変化の結果から考えて IF 分泌は pepsinogen 分泌と全く同様の機序で分泌されることが示唆された。

第2章 Pepsinogen 分泌に対する somatostatin の影響

Somatostatin はヒツジの視床下部から成長ホルモン分泌抑制因子として発見された14個のアミノ酸を持つ環状ペプチドで、下垂体からの成長ホルモンや TSH の放出を強く抑制することが明らかにされている⁴¹⁾。その後、radioimmuno-assay や免疫組織染色法の発展により somatostatin は中枢神経だけでなく末梢神経にも存在しており、消化管においてはほとんど全ての部位に somatostatin 含有細胞が同定されている。特に、胃粘膜 somatostatin 含有細胞 (D 細胞) は長い細胞突起を有し、gastrin 含有細胞や胃酸分泌細胞などへ延ばし somatostatin をパラクリンして生理的役割を果たしていると考えられている⁴²⁾。

胃に対する somatostatin の作用は胃酸や pepsinogen の分泌を抑制し⁴³⁾、gastrin の遊離に対しても抑制的に働くことが報告され^{44,45)}、gastrin 遊離あるいは胃酸分泌に対する抑制性の調節因子として働いていると考えられている。特に、somatostatin は、cAMP を介して酸分泌を引き起こす histamine に対し、cAMP の産生を抑制することによって酸分泌を抑制することがすでに明らかにされている⁴⁶⁾。

そこで本章では pepsinogen 分泌促進物質に対する somatostatin の作用を *in vivo* で検討すると同時に、遊離主細胞を用いて *in vitro* における直接作用の検討と second mediator への影響も検討した。

第1節 ラット胃内灌流法における pepsinogen 分泌に対する somatostatin の作用

生体における pepsinogen 分泌の調節機構の検討をするため、ラットの胃内灌流法を用いた。灌流を開始して、酸及び pepsinogen の基礎分泌量が安定する 90 min 後から分泌促進物質を股静脈より投与し分泌を測定した。さらに、90

min 後に somatostatin を股静脈より持続静注し、酸分泌が安定化してから最初と同量の分泌促進物質を投与した。代表的な酸及び pepsinogen 分泌パターンを Fig. 16. に示す。Control 値と somatostatin 持続静注後の値の比較は分泌促進物質投与後 1 時間の酸及び pepsinogen 分泌量で比較した（斜線部）。各種分泌促

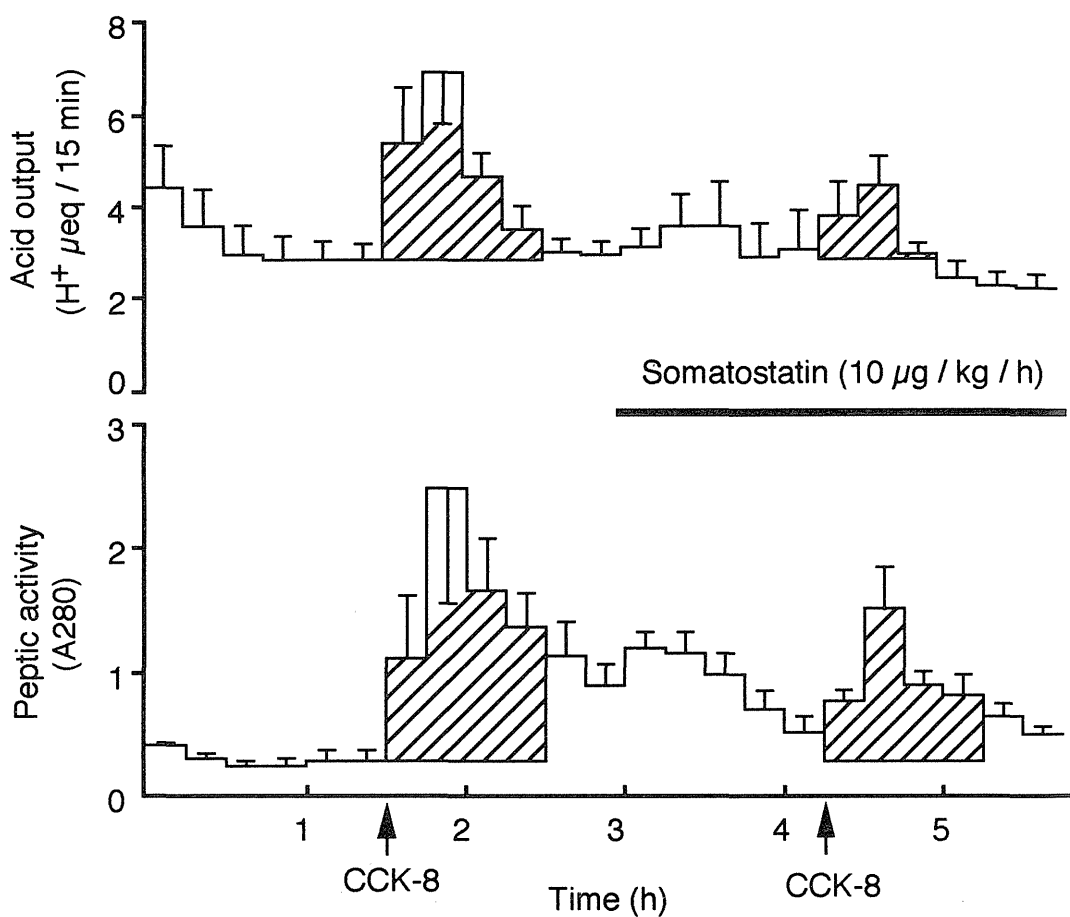


Fig. 16. Effects of Somatostatin on Gastric Acid and Pepsinogen Secretion Induced by CCK-8 in the Perfused Rat Stomach

Secretagogue and somatostatin were singly and continuously injected through the femoral vein, respectively. Hatched areas were used for calculation of the responses of acid and pepsinogen secretion to secretagogues before and after infusion of somatostatin (10 μg/kg/h) in Tables 3 and 4.

Table 3. Effects of Somatostatin on Gastric Acid Secretion Induced by Secretagogues

	Somatostatin ($\mu\text{g} / \text{kg} / \text{h}$)							
	0		2.5		5		10	
	Before	After	Before	After	Before	After	Before	After
Carbachol 5.0 $\mu\text{g} / \text{kg}$	17.5 ± 3.8	19.9 ± 5.2	18.1 ± 4.8	13.0 ± 5.0	19.8 ± 3.8	8.2 ± 5.7	11.6 ± 3.8	4.0 ± 1.3
CCK-8 5.7 $\mu\text{g} / \text{kg}$	6.8 ± 2.6	7.1 ± 1.3	7.6 ± 1.5	5.4 ± 1.3	6.8 ± 0.2	4.0 ± 1.1	9.5 ± 1.7	3.4 ± 1.0
Histamine 0.5 mg / kg	10.0 ± 2.2	9.7 ± 2.7	8.6 ± 2.0	9.9 ± 2.0	10.4 ± 1.8	3.8 ± 1.4	10.9 ± 3.6	6.6 ± 2.6
Pentagastrin 10 $\mu\text{g} / \text{kg}$	8.9 ± 1.5	10.7 ± 2.6	9.8 ± 2.9	9.6 ± 1.3	13.0 ± 5.8	4.3 ± 1.9	8.9 ± 1.0	7.8 ± 1.3

Each value is expressed as $\text{H}^+ \mu\text{eq/h}$ and is the mean \pm S.E. of four experiments.

Table 4. Effects of Somatostatin on Pepsin Secretion Induced by Secretagogues

	Somatostatin ($\mu\text{g} / \text{kg} / \text{h}$)							
	0		2.5		5		10	
	Before	After	Before	After	Before	After	Before	After
Carbachol 5.0 $\mu\text{g} / \text{kg}$	5.73 ± 0.68	3.94 ± 0.37	5.55 ± 1.25	4.35 ± 0.77	5.16 ± 0.85	1.97 ± 0.31	6.29 ± 0.96	3.53 ± 0.52
CCK-8 5.7 $\mu\text{g} / \text{kg}$	2.89 ± 1.44	2.62 ± 0.69	4.89 ± 0.33	3.71 ± 0.90	2.91 ± 0.22	3.30 ± 1.00	5.51 ± 2.09	2.91 ± 0.74
Histamine 0.5 mg / kg	2.90 ± 0.37	1.87 ± 0.43	2.33 ± 0.94	2.40 ± 0.76	1.03 ± 0.26	1.14 ± 0.35	2.52 ± 1.12	1.39 ± 0.65
Pentagastrin 10 $\mu\text{g} / \text{kg}$	5.59 ± 2.02	2.39 ± 0.67	5.36 ± 1.51	2.08 ± 0.63	6.24 ± 3.14	1.44 ± 0.49	4.47 ± 1.04	2.20 ± 0.40

Each value is expressed as U/h and is the mean \pm S.E. of four experiments.

進物質 (carbachol 5 $\mu\text{g/kg}$, CCK-8 5.7 $\mu\text{g/kg}$, histamine 0.5 mg/kg, pentagastrin 10 $\mu\text{g/kg}$) と各濃度の somatostatin (0, 2.5, 5, 10 $\mu\text{g/kg/h}$) を組み合わせたものの結果を Table 3 と 4 に示す。酸分泌反応については分泌促進物質の作用は概ね somatostatin によって抑制された。Carbachol と CCK-8 による酸分泌は濃度依存的に somatostatin によって抑制されたが、histamine と pentagastrin による酸分泌は somatostatin の 5 $\mu\text{g/kg/h}$ から抑制された。Pepsinogen 分泌における somatostatin の影響はばらつきが大きく明確な結果は得られなかったが、carbachol 又は CCK-8 による pepsinogen 分泌は somatostatin 5 又は 10 $\mu\text{g/kg/h}$ の濃度でそれぞれ明らかに抑制された。Histamine 又は pentagastrin による pepsinogen 分泌は somatostatin により有意には抑制されなかった。このように *in vivo* においてはこれら分泌促進物質による pepsinogen 分泌は個体間でのばらつきが大きく濃度依存的な反応を得ることは極めて困難であった。Table 4 の pepsinogen 分泌の検討の表中には control 値においても somatostatin の投与なしにもかかわらず約 55 % の減少を示す場合も見られ、pepsinogen のようなタンパク質の分泌が、分泌顆粒中の貯蔵量に影響されることが考えられ、タキフィラキシー現象により 2 回目の投与による反応が極端に低下し、比較できないケースも見られた。

第 2 節 細胞内 Ca^{2+} に対する somatostatin の影響

第 1 節の結果から示されたように、*in vivo* では pepsinogen 分泌に対する somatostatin の抑制反応は明確な濃度依存性を示さず明らかにできなかった。そこで、第 1 章で確立した実験系を用い somatostatin の主細胞への直接作用を細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇を引き起こすことにより pepsinogen を分泌させる carbachol と CCK-8 を用い検討した。

Carbachol と CCK-8 によって引き起こされた pepsinogen 分泌に対する

somatostatin の影響を Fig. 17 に示す。培養した主細胞において somatostatin は濃度依存的に carbachol (1×10^{-5} M) 又は CCK-8 (1×10^{-9} M) 刺激による pepsinogen 分泌を抑制し、somatostatin の 1×10^{-8} M から有意な抑制を示した。Somatostatin の 1×10^{-6} M におけるその抑制率は carbachol 刺激において約 30 %、CCK-8 刺激において約 50 % であった。しかし、細胞内 Ca^{2+} 上昇については somatostatin (1×10^{-6} M) は carbachol (1×10^{-5} M) 又は CCK-8 (1×10^{-9} M) の作用に対し medium 中の Ca^{2+} の存在、非存在に関係なく影響を与えなかった(Fig. 18)。

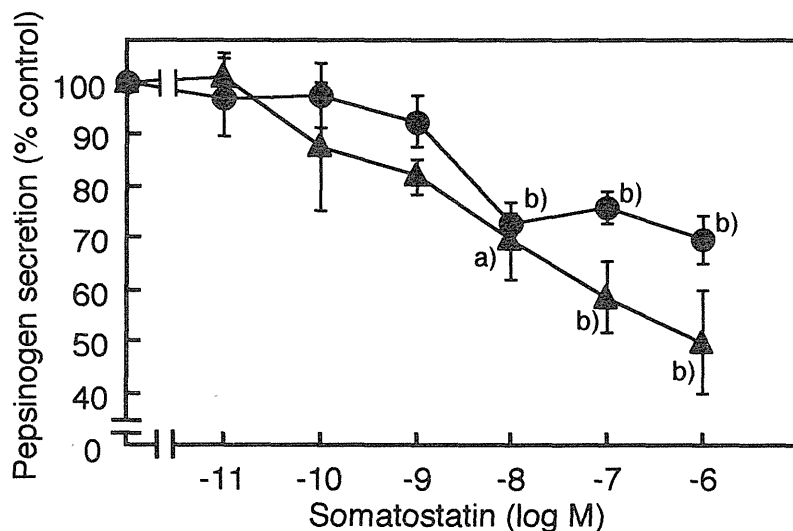


Fig. 17. Effects of Somatostatin on Carbachol- and CCK-8-Induced Pepsinogen Secretion

Cells were preincubated with indicated concentrations of somatostatin for 15 min and incubated with carbachol (1×10^{-5} M) (●) and with CCK-8 (1×10^{-9} M) (▲) for 30 min. The values for carbachol and CCK-8 are the mean \pm S.E. from five and four separate experiments, respectively. a) $p < 0.05$, b) $p < 0.01$.

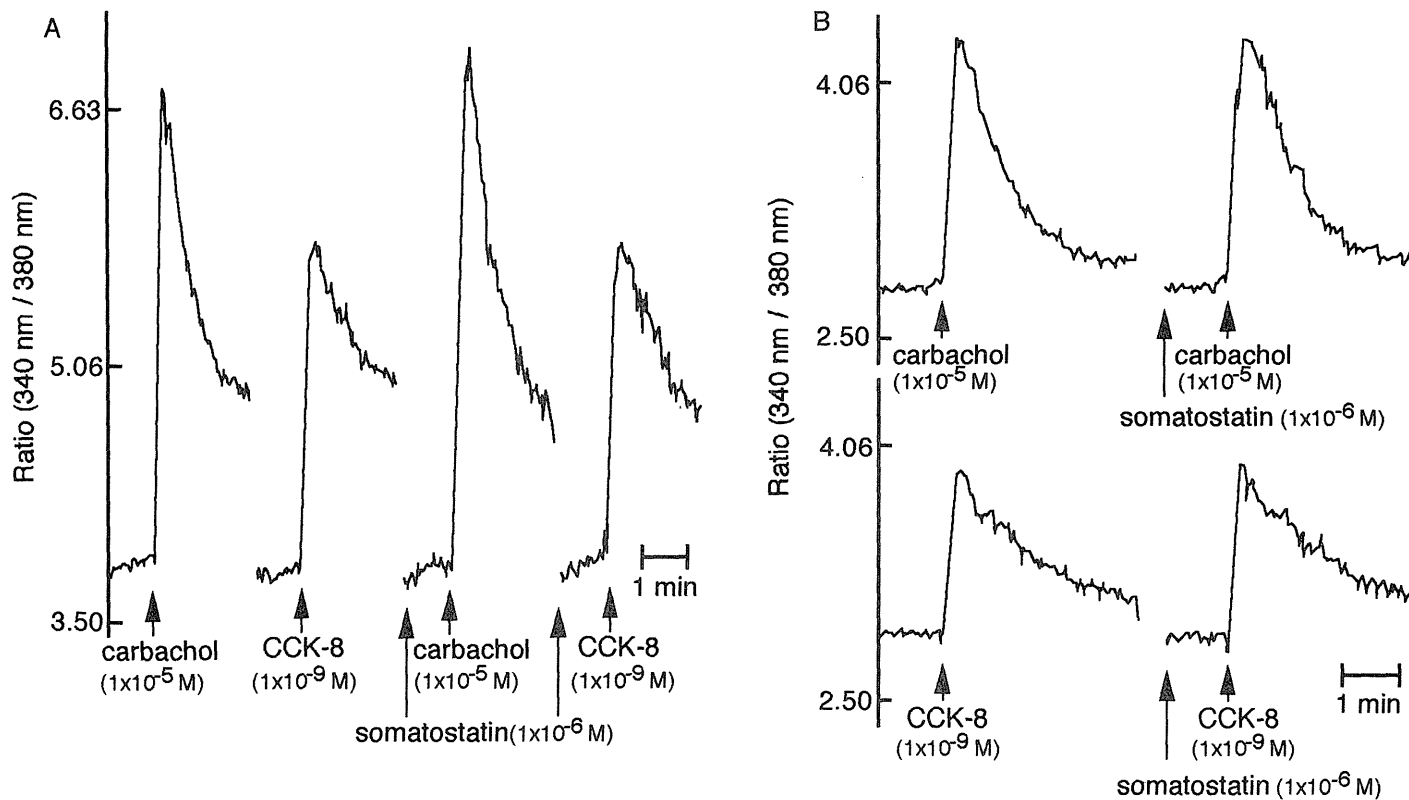


Fig. 18. Effects of Somatostatin on Carbachol- and CCK-8-Induced $[Ca^{2+}]_i$ Increase in Chief Cells in the Medium with (A) or without Ca^{2+} (B)

After preincubation with somatostatin for 1 min in medium with or without Ca^{2+} , the fluorescence changes of chief cells induced by carbachol or CCK-8 were measured.

第3節 細胞内 cAMP に対する somatostatin の影響

すでに述べたように secretin は主細胞からの pepsinogen 分泌に際して細胞内 cAMP 産生を介し分泌を惹起するペプチドである。また、forskolin は diterpene で adenylate cyclase の catalytic unit に直接作用し cAMP 産生を促すことが知られている。この2つの刺激物質を用いて pepsinogen 分泌及び cAMP 産生に対する somatostatin の影響を検討した。

Secretin と forskolin によって引き起こされた pepsinogen 分泌に対する somatostatin の影響を Fig. 19 に示す。培養した主細胞において somatostatin は濃度依存的に secretin (1×10^{-8} M) 又は forskolin (1×10^{-4} M) 刺激による pepsinogen 分泌を抑制し、secretin 刺激に対して somatostatin は 1×10^{-8} M から有意な抑制を示し、 1×10^{-6} M における抑制率は約 60 % であった。

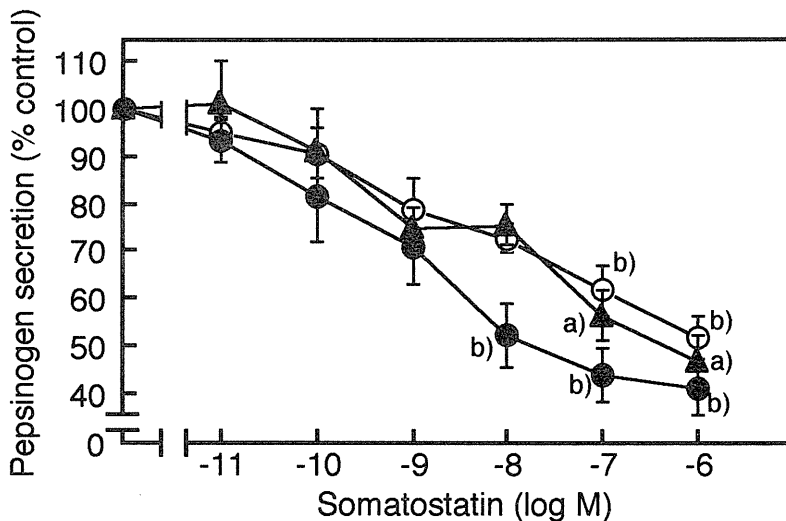


Fig. 19. Effects of Somatostatin on Secretin- and Forskolin-Induced Pepsinogen Secretion from Chief Cells

Cells were preincubated with indicated concentrations of somatostatin for 15 min, and then incubated with secretin (1×10^{-8} M) (●), forskolin (1×10^{-4} M) (▲) or secretin (1×10^{-8} M) plus IBMX (1×10^{-4} M) (○) for 30 min at 37 °C. Each value is the mean \pm S.E. of five separate experiments. a) $p < 0.05$, b) $p < 0.01$.

Forskolin 刺激に対して somatostatin は 1×10^{-7} M から有意な抑制を示し、 1×10^{-6} M におけるその抑制率は約 55 % であった。さらに、IBMX 存在下での secretin (1×10^{-8} M) 刺激においても somatostatin は 1×10^{-7} M から有意な抑制を示し、 1×10^{-6} M におけるその抑制率は約 50 % であった。次に、secretin と forskolin によって引き起こされた cAMP 産生に対する somatostatin の影響を Fig. 20 に示す。Secretin の 1×10^{-8} M 及び 1×10^{-9} M 刺激によって引き起こされた cAMP の産生は pepsinogen 分泌抑制と比較し somatostatin の高濃度領域で抑制された。Somatostatin (1×10^{-6} M) は secretin の 1×10^{-8} M 及び 1×10^{-9} M 刺激によって引き起こされた cAMP の産生をそれぞれ 73 % と 70 % に抑制した。しかし、forskolin によって引き起こされた cAMP 産生に対しては somatostatin の影響は認められなかった。

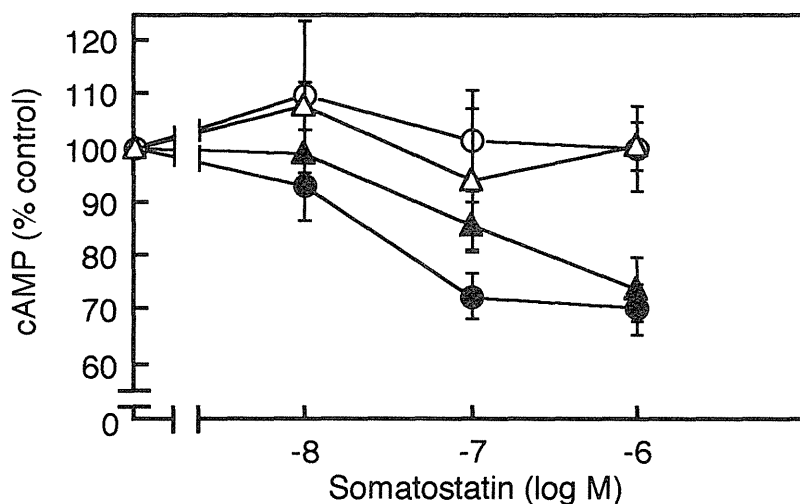


Fig. 20. Effects of Somatostatin on Secretin- and Forskolin-Induced cAMP Production in Chief Cells

Cells were preincubated with somatostatin for 5 min, and then incubated with secretin (●, 1×10^{-9} M; ▲, 1×10^{-8} M) or forskolin (○, 1×10^{-5} M; △, 1×10^{-4} M) for 10 min at 37 °C in the presence of IBMX (1×10^{-4} M). Each value is the mean \pm S.E. of four separate experiments.

受容体を介する adenylate cyclase の抑制には inhibitory guanine nucleotide binding (Gi or Go) protein の関与がよく知られている。Gi protein が pertussis toxin によって ADP リボシル化されると細胞膜受容体と共役する機能が失われると言われている。すなわち、受容体を介する細胞応答が pertussis toxin によって特異的に阻害されれば、その情報伝達系には pertussis toxin に感受性を示す G protein の関与が示される。そこで、調製した主細胞を培養する際に、pertussis toxin 100 ng/ml を含む培養液で培養し、pepsinogen 分泌に対する somatostatin の抑制効果について検討した。その結果を Table 5 に示す。分泌促進物質による pepsinogen 分泌は pertussis toxin 前処理によって影響を受けなかった。また、forskolin, carbachol 及び CCK-8 によって引き起こされた pepsinogen 分泌における somatostatin の抑制効果も pertussis toxin 前処理によって影響を受けなかった。しかし、secretin によって引き起こされた pepsinogen 分泌に対する somatostatin の抑制効果は pertussis toxin 前処理によって完全に解除された。

Table 5. Effects of Somatostatin on Secretagogue-Induced Pepsinogen Secretion from Chief Cells in the Presence or Absence of Pertussis Toxin

Secretagogue	Pepsinogen secretion (% total)			
	- Pertussis toxin		+ Pertussis toxin	
	None	Somatostatin	None	Somatostatin
None	1.06 ± 0.20	0.99 ± 0.34	1.00 ± 0.12	0.92 ± 0.16
Secretin (1×10 ⁻⁸ M)	3.96 ± 0.32	2.55 ± 0.22 b)	3.70 ± 0.41	4.47 ± 0.38
Forskolin (1×10 ⁻⁴ M)	4.61 ± 0.38	3.13 ± 0.34 a)	4.49 ± 0.31	3.41 ± 0.25 a)
Carbachol (1×10 ⁻⁵ M)	3.99 ± 0.28	3.11 ± 0.27 a)	3.78 ± 0.18	3.04 ± 0.15 a)
CCK-8 (1×10 ⁻⁹ M)	3.94 ± 0.27	3.15 ± 0.21 a)	4.16 ± 0.42	3.03 ± 0.22 a)

After pretreatment with pertussis toxin (100 ng/ml) for 24 h, cells were preincubated with or without somatostatin (1×10^{-6} M) for 15 min, and then incubated with secretagogues for 30 min at 37 °C. Each value is the mean ± S.E. of five separate experiments. a) $p < 0.05$, b) $p < 0.01$.

第4節 考察

一般的に somatostatin は生体においてホルモンの分泌や外分泌を抑制し、胃においては胃酸及び pepsinogen 分泌を抑制する^{41,43)}。これらの効果は somatostatin の構造が明らかにされた後、様々な研究者によって *in vitro* でも報告されてきた⁴⁷⁻⁴⁹⁾。しかし、胃液分泌に関する *in vitro* の研究では胃腺を用いた胃酸分泌が主なもので⁵⁰⁻⁵²⁾、特に pepsinogen 分泌に対する作用についてはカエル食道にある peptic cell を用いた研究以外にはあまり報告が無い^{53,54)}。著者は第1章で確立した実験系を用い *in vivo* 及び *in vitro* の両面から pepsinogen 分泌に対する somatostatin の影響を検討した。

胃内灌流法を用いた *in vivo* の実験において、somatostatin は酸分泌に関しては分泌促進物質の作用に対して明らかに抑制したが、pepsinogen 分泌に関してははっきりした抑制結果を得ることができなかった。*In vivo* の実験において明瞭な結果が得られなかった理由は幾つか考えられるが、まず、pepsinogen の分泌が主細胞中に含有されるチモーゲン顆粒の量と刺激物質の濃度に依存していることが考えられる。すなわち、最初の刺激による反応で主細胞中のチモーゲン顆粒の量が減少し、次の同量の刺激に対しては分泌量が減少するいわゆるタキフィラキシー現象が現われると考えられる。また、胃腺腔の中に溜まっている pepsinogen が酸分泌に伴って流れ出す "wash out" 現象なども定量性を損なう。その他にも、somatostatin はパラクリンにより局所的に反応するホルモンであると考えられるので、静脈投与では全身性の反応が現われたり、代謝されて局所での反応が弱いことなども考えられる。Histamine 及び gastrin に関しては第1章でも述べたようにラット主細胞からの pepsinogen 分泌をほとんど刺激しなかった。従って、ラットを用いた *in vivo* 実験においても histamine 及び gastrin は pepsinogen 分泌をあまり刺激しないため、somatostatin による抑制が観察されない結果になったと推察される。そこで、より直接的で安定した応答が得られる

培養主細胞を用いて検討を行った。

Somatostatin が主細胞に直接作用し pepsinogen 分泌を抑制する現象は carbachol と CCK-8 のように細胞内 Ca^{2+} を上昇させることにより pepsinogen を分泌させる刺激に対しても認められた。一般に somatostatin は受容体に結合した後 Gi タンパク質の活性化により adenylate cyclase を抑制すると言われているので、イノシトールリン酸を second mediator とする反応にどのような関わっているのか興味があった。しかし、結果の項に示したように somatostatin は medium 中での Ca^{2+} の存在の有無に関係なく carbachol や CCK-8 の細胞内 Ca^{2+} の上昇作用に影響を及ぼさなかった。このことはラット主細胞において somatostatin が Ca^{2+} チャンネルや phospholipase C に対しては抑制的に作用しないことを示している。同様な結果はイヌ壁細胞を用いた carbachol や gastrin による酸分泌及び IP_3 産生に対する somatostatin の影響を検討した実験でも報告されている⁴⁶⁾。従って、somatostatin による carbachol や CCK-8 による pepsinogen 分泌の抑制は受容体刺激- Ca^{2+} 濃度上昇に対する作用ではなく、それ以降の分泌に関連した反応のどこかを抑制したことによると考えられる。

主細胞においては secretin による pepsinogen 分泌は cAMP の産生を介している。Somatostatin は secretin による pepsinogen 分泌を抑制しただけでなく、cAMP の産生をも抑制した。そして、somatostatin による pepsinogen 分泌抑制は pertussis toxin の前処理によって影響を受けた。この結果は犬の壁細胞を用いた histamine (H_2 -receptor) 刺激に対する somatostatin 作用の研究と同様な結果を示している⁴⁶⁾。すなわち、somatostatin 受容体が pertussis toxin 感受性 G protein (Gi or Go protein) と共役していることを示している。比較として用いた forskolin 刺激による pepsinogen 分泌は somatostatin によって抑制されたが、cAMP 産生は抑制されなかった。また、carbachol や CCK-8 の場合と同様 pertussis toxin 前処理によっても somatostatin の抑制効果は解除されなかつ

た。このことから somatostatin の pepsinogen 分泌抑制効果は、cAMP を second mediator とする系でも受容体部位ばかりでなく、分泌過程のどこかにも作用部位が存在することが示唆された。

Somatostatin の作用については様々な研究が行われ、ラット膵腺房細胞においては somatostatin が bombesin によるイノシトールリン脂質の代謝亢進を抑制し⁵⁵⁾、さらに medullary carcinoma cell においては norepinephrine による細胞内 Ca^{2+} 上昇を抑制する等の報告もある⁵⁶⁾。また、somatostatin の作用としてタンパクへのリン酸化の抑制、脱リン酸化の促進⁵⁷⁾、 K^+ チャンネルの開口による細胞の過分極⁵⁸⁾、さらに分泌顆粒の開口放出の抑制等も報告され⁵⁹⁾、最近では somatostatin 受容体のクローニングも行われ 5 つのサブタイプが存在することまで確認されている^{60,61)}。ラット胃粘膜主細胞においては、somatostatin が carbachol や CCK-8 による pepsinogen 分泌のどこを抑制するのか決めることはできなかったが、少なくとも、受容体以外にも somatostatin の作用部位があることを明らかにすることができた。

第3章 Pepsinogen 分泌に対する分泌促進物質間の相互作用

前章においてラット胃主細胞からの pepsinogen 分泌は carbachol, CCK-8, secretin によって惹起されることを確認し、さらに、pepsinogen 分泌におけるそれぞれの受容体と細胞内伝達物質の関係を明らかにした。すなわち、pepsinogen 分泌には少なくとも2つの経路があり、一つは carbachol や CCK-8 に代表されるイノシトールリン脂質の代謝を介した経路、もう一つは secretin に代表される cAMP の産生を介する経路である。

我々が食事を摂る場合を考えたとき、脳相や胃の反射的な分泌に関する迷走神経と、それらと協同して作用すると考えられるホルモンやオータコイドが同時に作用していると考えられる。すなわち、消化時にはこれら種々の生理活性物質が一体となって消化活動を調節していると考えられる。分泌機序の異なる2つの刺激物質が同時に作用した場合、それぞれ単独の刺激による分泌の和よりも分泌が増加する、いわゆる相乗作用はすでに膵腺房細胞からの酵素分泌⁶²⁾、さらには酸分泌においてすでに知られている⁶³⁻⁶⁵⁾。Pepsinogen 分泌においても相乗効果に関する報告が幾つかあり、cholera toxin で前処理した主細胞を細胞内 Ca^{2+} を増加させる薬物で刺激したとき、cAMP の増加が認められ相乗作用を表わしている。この反応は細胞外 Ca^{2+} の除去、calmodulin 阻害薬を加えることにより消失することから cholera toxin と Ca^{2+} 依存性薬物の間の相乗作用は cAMP の増加によるものではないか、と考えられている⁶⁶⁾。しかし、この相互作用は cholera toxin 前処理の場合に限られ、処理されない状態では現われてこない。

著者は pepsinogen 分泌に対する分泌促進物質の相互作用を検討するにあたり、まず、second mediator どうしの組み合わせによる pepsinogen 分泌を比較することにより pepsinogen 分泌促進剤の相乗作用と受容体間の相互作用について検討した。cAMP を増加させる生理的物質として secretin、細胞内 Ca^{2+} を増加させる物質として carbachol と CCK-8 を用いた。

第1節 培養ラット胃主細胞に対する pepsinogen 分泌促進物質の組み合わせによる効果

Carbachol や CCK-8 は受容体と結合後 phospholipase C を活性化し、イノシトールリン脂質を IP_3 と DG に代謝し、 IP_3 が細胞内 Ca^{2+} 上昇、DG が protein kinase C を活性化すると考えられる。他方、secretin は cAMP の産生を促進することはすでに本論文でも明らかにし、他の動物の胃主細胞でも認められている。そこで、細胞内 Ca^{2+} を上昇させる試薬として Ca^{2+} ionophore の A23187, protein kinase C 活性化物質として phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), cAMP 様物質として細胞膜通過型の dibutyryl cAMP (dbcAMP) を用いて検討した。まず初めに、pepsinogen 分泌に対する A23187, PMA 及び dbcAMP の作用を検討した (Fig. 21)。PMA は 1×10^{-10} M, A23187 は

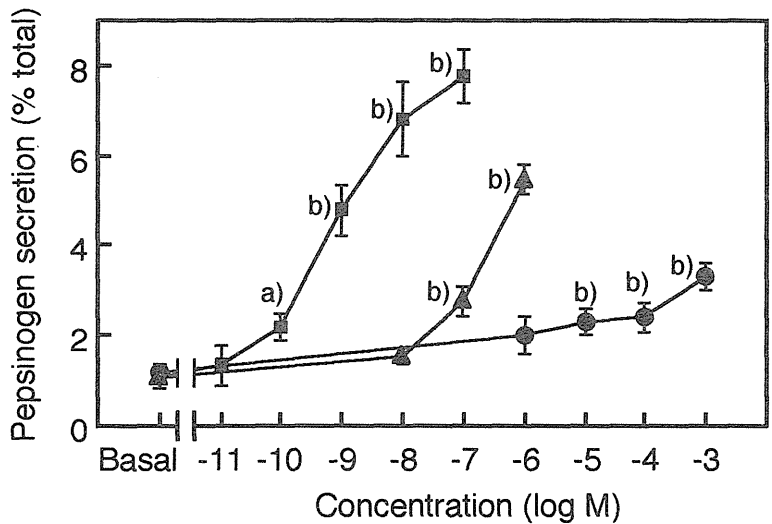


Fig. 21. Effects of A23187, PMA and dbcAMP on Pepsinogen Secretion from Chief Cells

Cells were incubated with the indicated concentrations of A23187 (\blacktriangle), PMA (\blacksquare) and dbcAMP (\bullet) for 30 min at 37 °C. Each value is the mean \pm S.E. of five separate experiments. a) $p < 0.05$, b) $p < 0.01$.

1×10^{-7} M, dbcAMP は 1×10^{-5} M から濃度依存的に有意に pepsinogen 分泌を促進した。次に、これら刺激物質の組み合わせによる pepsinogen 分泌についての相互作用を検討した (Table 6)。その結果、どの組み合わせによっても相乗的な pepsinogen 分泌促進が示された。

Table 6. Effects of A23187, PMA, dbcAMP and Combinations of Each Chemical on Pepsinogen Secretion

Secretagogues	Pepsinogen secretion (% total)
None	0.42 ± 0.06
A23187 (1×10^{-7} M)	3.34 ± 0.35
PMA (1×10^{-10} M)	2.69 ± 0.38
dbcAMP (1×10^{-3} M)	2.62 ± 0.17
A23187 + PMA	9.47 ± 1.35
A23187 + dbcAMP	10.12 ± 1.02
dbcAMP + PMA	8.80 ± 0.52
A23187 + PMA + dbcAMP	17.78 ± 1.34

Each value is the mean \pm S.E. of five separate experiments.

そこで細胞内情報伝達機序の異なる pepsinogen 分泌促進作用を持つ受容体刺激物質の相互作用の検討を行った。cAMP を second mediator とする生理活性物質として secretin (1×10^{-8} M) を用い、 Ca^{2+} を mediator とする生理活性物質として carbachol と CCK-8 を用い併用効果を検討した。Carbachol, CCK-8 とともに secretin (1×10^{-8} M) 存在下で、相乗的な pepsinogen 分泌を示した (Fig. 22)。点線は secretin (1×10^{-8} M) 単独刺激による pepsinogen 分泌を相加的に計算をした値であり、実際の反応はこの線より反応が大きく、相乗の効果であることがわかる。Carbachol は 1×10^{-5} M から相加値に対し有意に

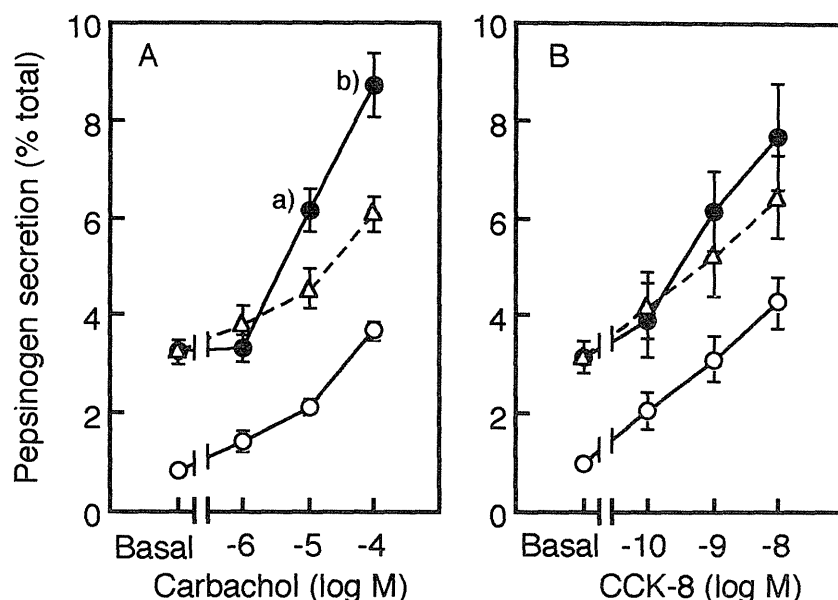


Fig. 22. Effects of Secretin with Carbachol or CCK-8 on Pepsinogen Secretion from Chief Cells

Cells were incubated with the indicated concentrations of carbachol (○) or secretin (1×10^{-8} M) plus carbachol (●) (A) and CCK-8 (○) or secretin (1×10^{-8} M) plus CCK-8 (●) (B) for 30 min at 37 °C, and then pepsinogen in a medium was measured by ELISA. Dashed lines (△) represent calculated values of pepsinogen concentration with the addition of secretin (1×10^{-8} M) and dose-response curves of carbachol or CCK-8. Each value is the mean \pm S.E. of five separate experiments. Significant differences between calculated values of carbachol plus secretin and those obtained by experiment (A) and those for CCK-8 plus secretin (B): a) $p < 0.05$, b) $p < 0.01$.

pepsinogen 分泌を促進したが、CCK-8 では相加値以上に促進したものの有意差は認められなかった。この作用の違いが secretin のような受容体を介する刺激によってのみ認められるのかどうかを検討するために adenylate cyclase の活性化物質である forskolin を用いて検討した (Fig. 23)。Carbachol, CCK-8 ともに forskolin (1×10^{-4} M) との組み合わせによっても secretin 同様、相乗的な

pepsinogen 分泌を示した。しかも、その相乗作用は secretin との組み合わせよりも強く、また両者の間では CCK-8 の方が carbachol より強い相乗作用が観察された。

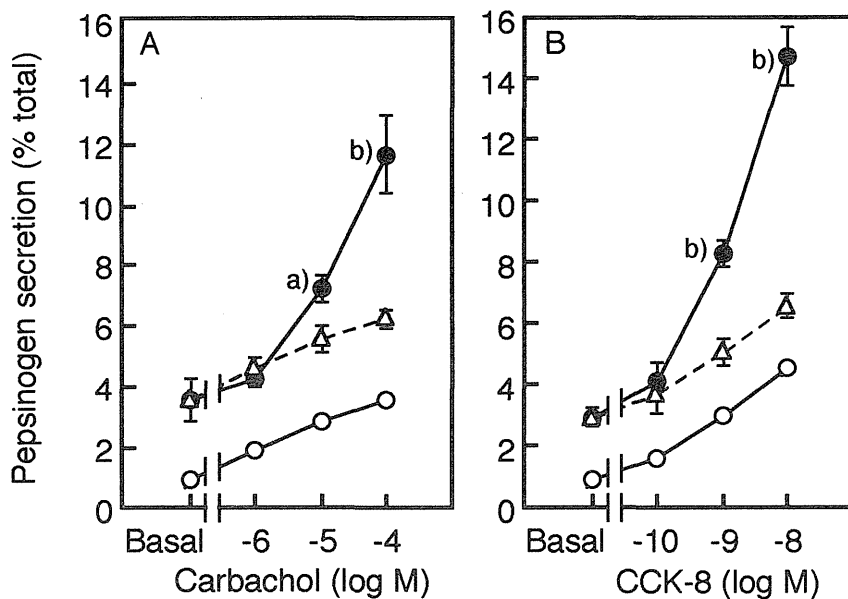


Fig. 23. Effects of Forskolin with Carbachol or CCK-8 on Pepsinogen Secretion from Chief Cells

Cells were incubated with the indicated concentrations of carbachol (○) or forskolin (1×10^{-4} M) plus carbachol (●) (A) and CCK-8 (○) or forskolin (1×10^{-4} M) plus CCK-8 (●) (B) for 30 min at 37 °C, and then pepsinogen in a medium was measured by ELISA. Dashed lines (△) represent calculated values of pepsinogen concentration with the addition of forskolin (1×10^{-4} M) and dose-response curves of carbachol or CCK-8. Each value is the mean \pm S.E. of five separate experiments. Significant differences between calculated values of carbachol plus forskolin and those obtained by experiment (A) and those for CCK-8 plus secretin (B): a) $p < 0.05$, b) $p < 0.01$.

第2節 Second mediator の産生量に対する分泌促進物質の組み合わせによる影響

作用機序の異なる pepsinogen 分泌促進物質を組み合わせることにより起こる相乗作用が second mediator の産生にどのように影響するのか検討した。まず、細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇作用に対する相互作用を検討した (Fig. 24)。Carbachol 又は CCK-8 によって引き起こされる細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇は、IBMX (1×10^{-4} M) 存在下 secretin 及び forskolin の前処理によって影響を受けなかった。デー

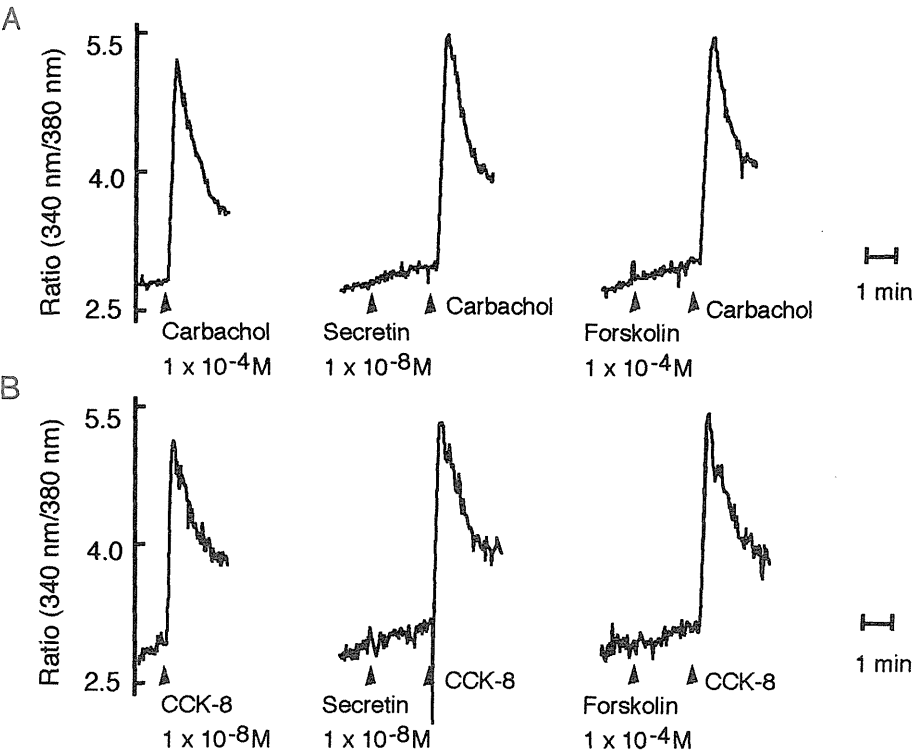


Fig. 24. Effects of Secretin or Forskolin on $[\text{Ca}^{2+}]_i$ Increase Induced by Carbachol and CCK-8 in the Presence of IBMX

After fura-2 loaded cells (2×10^6 cells/ml) were preincubated with IBMX for 1 min, the changes of fluorescence ratio (340 nm/380 nm) in chief cells induced by carbachol (A) or CCK-8 (B) were measured. Chemicals were added at times indicated by arrows.

ターには示さないが、IBMX 非存在下においても影響を受けなかった。さらに、共に細胞内 Ca^{2+} 上昇を引き起こす carbachol ($1 \times 10^{-4} \text{ M}$) と CCK-8 ($1 \times 10^{-8} \text{ M}$) を組み合わせると細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇は単独の場合より高い値を示したが、相加的な上昇にはならなかった (Fig. 25)。また、pepsinogen 分泌においても相加値より低い分泌しか示さなかった (Table 7)。

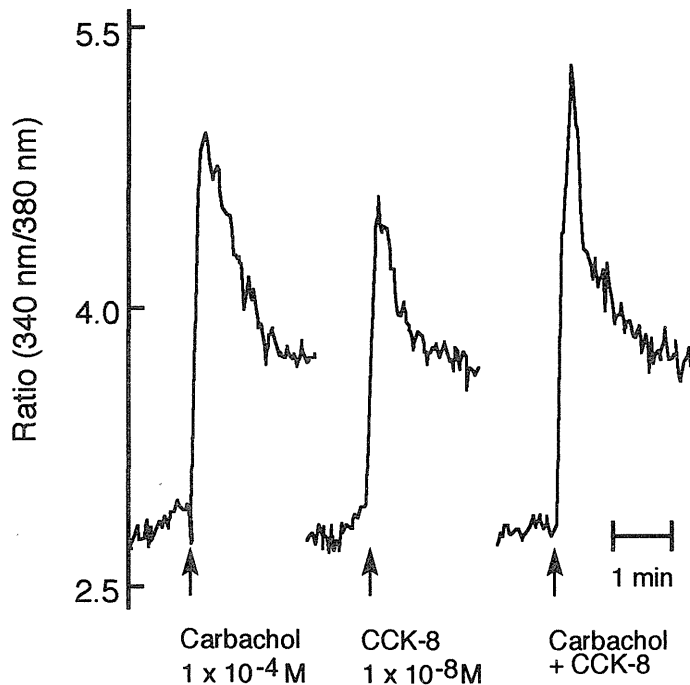


Fig. 25. Effects of Carbachol and CCK-8 on $[\text{Ca}^{2+}]_i$ Increase

After cells (2×10^6 cells/ml) were loaded with fura-2, the changes of fluorescence ratio (340 nm/380 nm) in chief cells induced by carbachol, CCK-8 or carbachol plus CCK-8 were measured.

Table 7. Effects of Carbachol, CCK-8, Secretin and Combinations of Each Chemical on Pepsinogen Secretion

Secretagogues	Pepsinogen secretion (% total)
None	1.08 ± 0.08
Carbachol (1×10^{-4} M)	4.11 ± 0.76
CCK-8 (1×10^{-8} M)	3.20 ± 0.11
Carbachol + CCK-8	5.46 ± 0.50
Secretin (1×10^{-8} M)	3.30 ± 0.12
Carbachol + Secretin	9.31 ± 1.09
CCK-8 + Secretin	7.64 ± 0.37

Each value is the mean ± S.E. of four separate experiments.

次に、secretin によって引き起こされる cAMP 産生に対する carbachol 及び CCK-8 の影響を検討した (Fig. 26)。Carbachol 及び CCK-8 の前処理により濃度依存的に secretin によって引き起こされる cAMP 産生を減少させた。Carbachol は 1×10^{-4} M で有意に減少させ、その減少率は 36.5 % であった。CCK-8 は 1×10^{-9} M から有意に減少させ、その減少率は 1×10^{-9} M で 35.8 %、 1×10^{-8} M で 45 % であり、濃度依存的であった。一方、forskolin によって引き起こされる cAMP 産生に対する影響は secretin の場合とは全く異なり、逆に carbachol の 1×10^{-4} M において有意差は認められないが、18.7 % 増加させた。CCK-8 は forskolin によって引き起こされる cAMP 産生を濃度依存的に増加させ 1×10^{-9} M から有意に促進した。その増加率は 1×10^{-9} M で 33.1 %、 1×10^{-8} M で 40.4 % であり、濃度依存的であった。

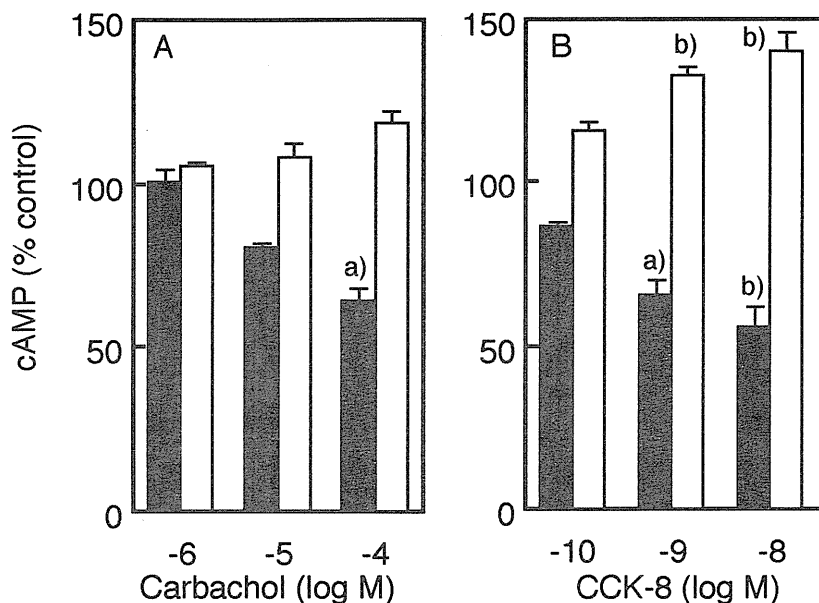


Fig. 26. Effects of Carbachol and CCK-8 on cAMP Production Induced by Secretin or Forskolin

Cells (1×10^6 cells/ml) were incubated with the indicated concentrations of carbachol plus secretin (1×10^{-8} M) (■) or forskolin (1×10^{-4} M) (□) (A) and CCK-8 plus secretin (1×10^{-8} M) (■) or forskolin (1×10^{-4} M) (□) (B) for 10 min at 37 °C in the presence of IBMX (1×10^{-4} M). Concentrations of cellular cAMP were measured by the method described in the text. The cAMP concentration induced by secretin (1×10^{-8} M) was about 6.98 ± 0.66 pmol/ 10^6 cells. Each value is the mean \pm S.E. of five separate experiments. a) $p < 0.05$, b) $p < 0.01$.

Fig. 27 に secretin 及び forskolin によって引き起こされる cAMP 産生に対する A23187 と PMA の影響を示す。両薬物ともに cAMP 産生に対する影響は認められなかった。

次に、carbachol 及び CCK-8 の secretin によって引き起こされる cAMP 産生の減少作用をそれぞれの競合的阻害薬である atropine 及び lorglumide を用いて検討した (Fig. 28)。Atropine 及び lorglumide は濃度依存的に carbachol

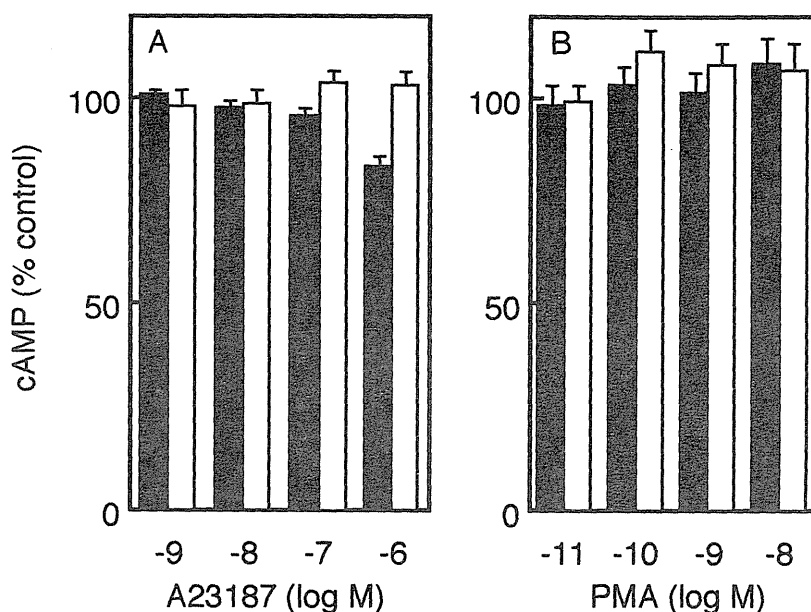


Fig. 27. Effects of A23187 and PMA on cAMP Production Induced by Secretin or Forskolin

Cells (1×10^6 cells/ml) were incubated with the indicated concentrations of A23187 plus secretin (1×10^{-8} M) (■) or forskolin (1×10^{-4} M) (□) (A) and PMA plus secretin (1×10^{-8} M) (■) or forskolin (1×10^{-4} M) (□) (B) for 10 min at 37 °C in the presence of IBMX (1×10^{-4} M). The cAMP concentration induced by secretin (1×10^{-8} M) was about 6.20 ± 0.66 pmol/ 10^6 cells. Each value is the mean \pm S.E. of five separate experiments.

(1×10^{-4} M) 及び CCK-8 (1×10^{-8} M) による cAMP の減少を阻止した。そこで、この阻止が carbachol または CCK-8 刺激による pepsinogen 分泌及び細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇などの生理的な反応に対する抑制効果と関連した同一の作用であるのかどうかの検討を行った。Fig. 29 に carbachol (1×10^{-4} M) 及び CCK-8 (1×10^{-8} M) それぞれの刺激に対する atropine 及び lorglumide の効果を示す。細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇においてはチャートで示し、carbachol (1×10^{-4} M) 及び CCK-8 (1×10^{-8} M) 刺激に対する反応を 100 % として示した。Carbachol

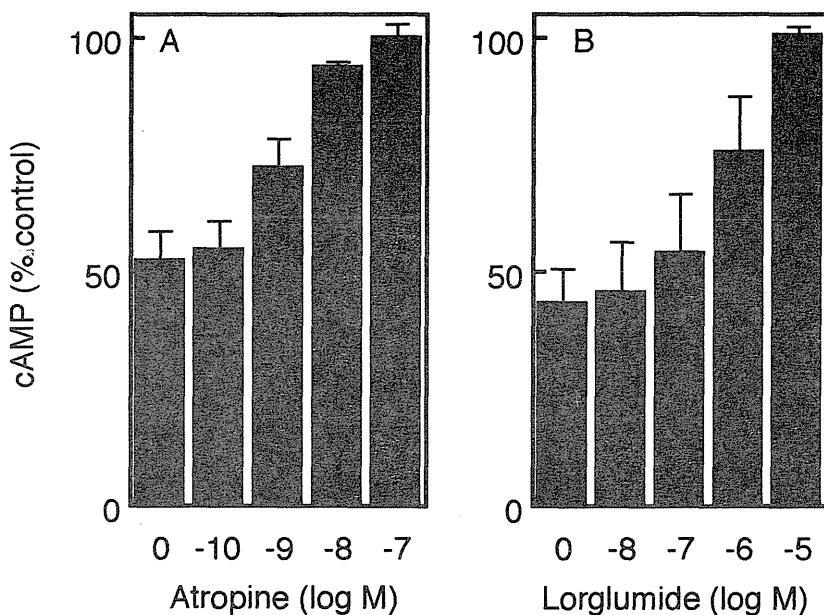


Fig. 28. Effects of Atropine and Lorglumide on Secretin-Induced cAMP Production Reduced by Carbachol or CCK-8

Cells (1×10^6 cells/ml) were incubated with the indicated concentrations of atropine to the medium containing carbachol (1×10^{-4} M) and secretin (1×10^{-8} M) (A) and lorglumide to the medium containing CCK-8 (1×10^{-8} M) and secretin (1×10^{-8} M) (B) for 10 min at 37 °C in the presence of IBMX (1×10^{-4} M). Each value is the mean \pm S.E. of five separate experiments.

(1×10^{-4} M) 刺激による pepsinogen 分泌、細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇、そして secretin によって引き起こされた cAMP 産生の減少に対して、atropine は濃度依存的にその作用を抑制し、それぞれの反応に対する 50 % inhibitory concentration (IC_{50}) 値は 1.5×10^{-9} M, 1.5×10^{-9} M 及び 1.3×10^{-9} M であった。Lorglumide のそれぞれの反応に対する IC_{50} 値は 2.4×10^{-7} M, 3.5×10^{-7} M 及び 4.0×10^{-7} M であった。

第2章において somatostatin は secretin の刺激によって引き起こされる cAMP 産生を抑制することを確認した。そこで、今回は CCK-8 が secretin に

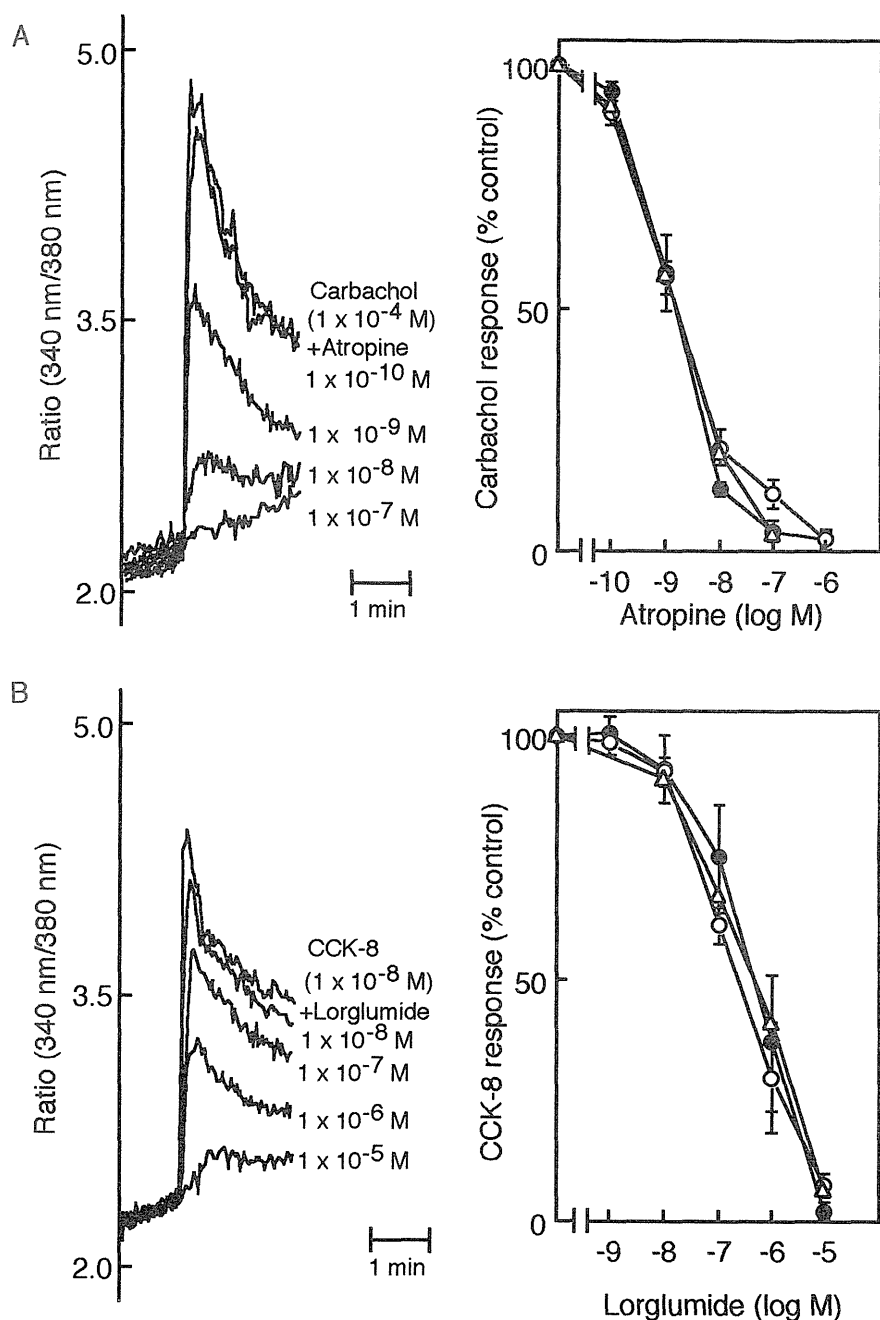


Fig. 29. Effects of Atropine or Lorglumide on Pepsinogen Secretion, $[Ca^{2+}]_i$ Increase and Secretin-Induced cAMP Production Reduced by Carbachol or CCK-8

$[Ca^{2+}]_i$ increase (\triangle), pepsinogen secretion (\circ) and cellular cAMP decrease (\bullet) are expressed as percentage of the responses to carbachol (1×10^{-4} M) (A) or CCK-8 (1×10^{-8} M) (B). Values of pepsinogen secretion and cellular cAMP decrease are the mean \pm S.E. of four separate experiments.

より引き起こされた cAMP の産生を抑制する作用に somatostatin がどのように関係するかを検討した (Fig. 30)。Somatostatin は secretin の刺激による cAMP 産生を濃度依存的に抑制し、 1×10^{-6} M でその抑制率は約 55 % であった。これらの結果は Fig. 20 とおおむね同じであるが、secretin の cAMP 産生作用に対する CCK-8 (1×10^{-8} M) の抑制作用については、somatostatin はそれをさらに濃度依存的に抑制し、 1×10^{-6} M では約 70 % の抑制率であった。

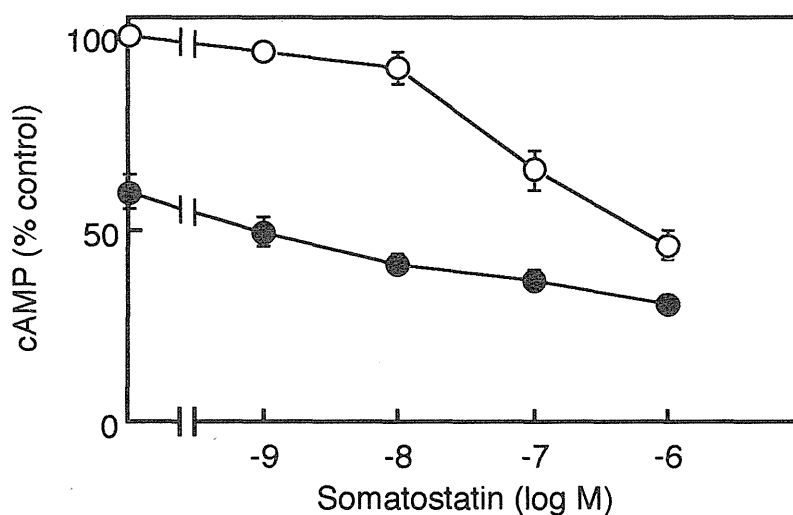
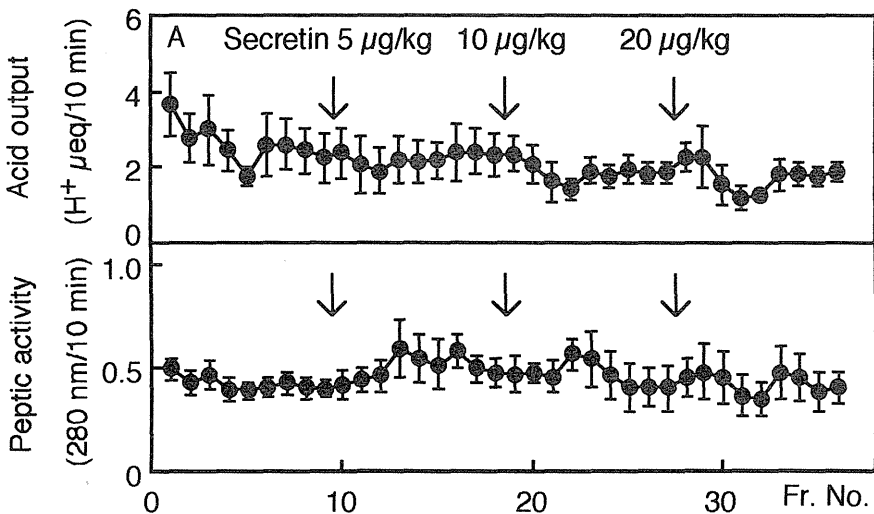


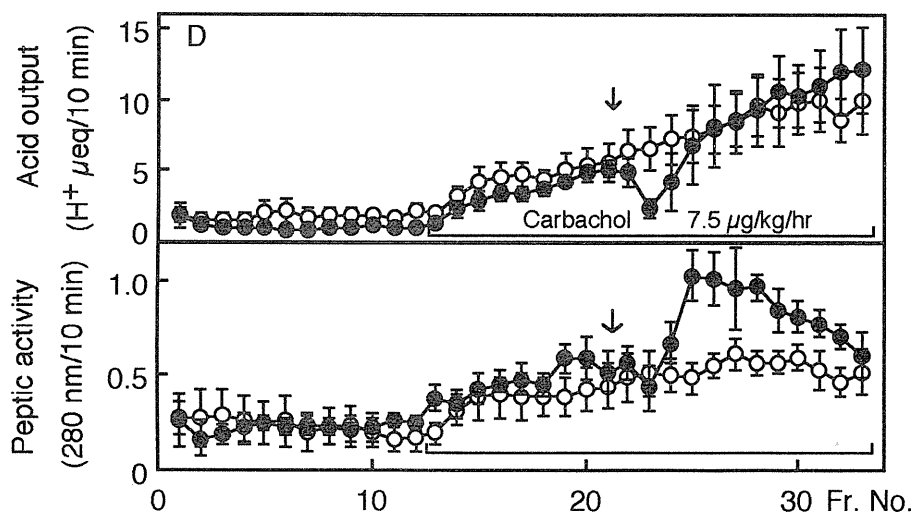
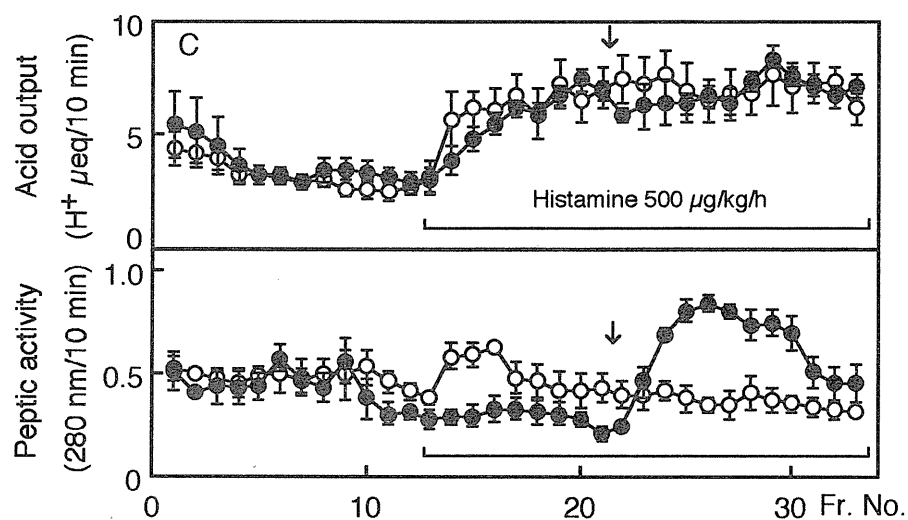
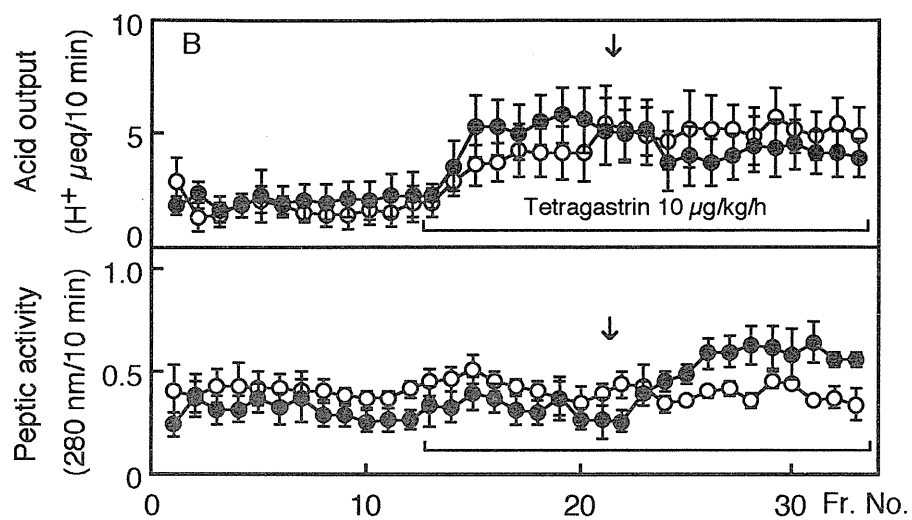
Fig. 30. Effects of Somatostatin and CCK-8 on Secretin-Induced cAMP Production

Cells (1×10^6 cells/ml) were incubated with the indicated concentrations of somatostatin (○) or somatostatin plus CCK-8 (1×10^{-8} M) (●) for 10 min at 37 °C in the presence of secretin (1×10^{-8} M) and IBMX (1×10^{-4} M). Each value is the mean \pm S.E. of five separate experiments.

第3節 ラット胃内灌流法における secretin と各種分泌促進物質の組み合わせによる酸及び pepsinogen 分泌の検討

Secretin は単独ですでに酸分泌を抑制することが知られているので、胃内灌流法を用いて secretin と各種分泌促進物質の組み合わせによる酸及び pepsinogen 分泌を検討した。まず、secretin の単独投与による効果の基礎データを得るため、secretin を 90 min ごとに 5, 10, 20 $\mu\text{g/kg}$ を股静脈より投与した (Fig. 31 A)。酸分泌においては secretin 投与によりほぼ濃度依存的に基礎分泌量よりわずかであるが減少させた。Pepsinogen 分泌においては 5 及び 10 $\mu\text{g/kg}$ の投与により若干増加させた。しかし、20 $\mu\text{g/kg}$ 投与後、酸分泌の減少と一致して pepsinogen 分泌量に減少が観察された。各種分泌促進物質と secretin の組み合わせについては分泌促進物質を股静脈より持続静注下にもう一方の股静脈より secretin を 10 $\mu\text{g/kg}$ 投与する方法を用いた。Tetragastrin と





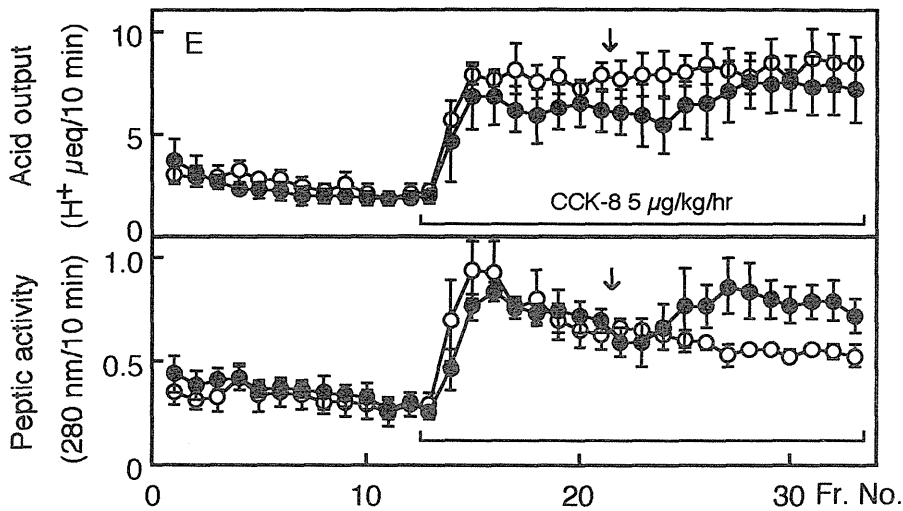


Fig. 31. Effects of Some Concentrations of Secretin and Combinations of Secretin with Other Secretagogues on Pepsinogen and Acid Secretion in Rat Gastric Perfusion

Secretin and other secretagogues were singly and continuously injected through the femoral vein, respectively. Perfusion rate was 0.5 ml/min, and perfusate was collected every 10 min. An injection of saline (○) or secretin (●) is shown at an arrow. The indicated doses of chemicals are as follows: A, secretin 5, 10 and 20 $\mu\text{g/kg}$; B, secretin 10 $\mu\text{g/kg}$, tetragastrin 10 $\mu\text{g/kg/h}$; C, secretin 10 $\mu\text{g/kg}$, histamine 500 $\mu\text{g/kg/h}$; D, secretin 10 $\mu\text{g/kg}$, carbachol 7.5 $\mu\text{g/kg/h}$; E, secretin 10 $\mu\text{g/kg}$, CCK-8 5 $\mu\text{g/kg/h}$. Each value is the mean \pm S.E. of four separate experiments.

histamine は、単独では遊離主細胞からの pepsinogen 分泌を刺激しなかったが、それらを持続投与しながら secretin を投与すると pepsinogen 分泌を促進した。一方、酸分泌においては secretin 投与により tetragastrin の作用を持続的に約 30 ~ 40 % 抑制し、histamine の作用をわずかに減少させただけであった (Fig. 31 B,C)。Pepsinogen 分泌を刺激する carbachol と CCK-8 の持続投与において secretin は carbachol 及び CCK-8 による pepsin 分泌を増加させた (Fig. 31 D,E)。

第4節 考察

Pepsinogen 分泌を促進する物質及びその second mediator 間の相互作用を検討した。Second mediator 間の相互作用を想定し Ca^{2+} ionophore や second mediator のアナログ体どうしを組み合わせると、pepsinogen 分泌は相乗的に強く促進された。この強い相乗作用はカエル peptic cell を用いた報告と同様の結果であった⁶⁷⁾。しかし、異なる second mediator を介して pepsinogen を分泌させる受容体刺激物質どうしを組み合わせたとき、どのような反応が得られるかについてはラット胃腺を用いた初期の報告しかない⁶⁸⁾。そこで、受容体刺激により細胞内 cAMP 産生を促す secretin と イノシトールリン脂質の代謝を促す carbachol 又は CCK-8 の組み合わせについて検討したところ、相乗的な pepsinogen 分泌が得られた。しかし、その相乗作用は second mediator の代替物質の組み合わせによる pepsinogen 分泌の相乗作用と比較すると低いものであった。さらに、secretin に対する carbachol と CCK-8 では相乗効果に違いが観察され、CCK-8 との併用のほうが低かった。このことは、CCK-8 と carbachol が細胞内 Ca^{2+} 上昇を引き起こすことは同じであるが、他に異なった作用があることを示している。モルモット膵腺房細胞を用いた ^{125}I -secretin 結合実験において CCK-8 及び carbachol は ^{125}I -secretin の結合になんら変化をもたさないという報告もあることから少なくとも secretin の受容体への結合に carbachol や CCK-8 が競合的に作用したり、受容体の親和性が変化していることはないと考えられる⁶⁹⁾。そこで、これら相互作用は secretin のような受容体を介して産生される second mediator にあるのではないかと予想されたので、まず adenylate cyclase の直接的な活性化剤である forskolin を用いて検討した。Carbachol 又は CCK-8 と forskolin との組み合わせは secretin との組み合わせより相乗的な強い pepsinogen 分泌が認められた。従って、刺激物質間の相互作用が細胞内伝達物質の量的変化にあると考え検討を行った。一方、これら刺激物

質間の相互作用でも carbachol や CCK-8 のように同じ細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を引き起こすもののどうしの組み合わせでは細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇及び pepsinogen 分泌ともにそれぞれの反応の増加が見られたが、それぞれの相加値よりも低い値であった。同様の現象は酸を分泌する壁細胞においても見られ、細胞内 Ca^{2+} を介して作用する gastrin と carbachol の組み合わせによる酸分泌は cAMP 産生を second mediator とする histamine (H_2 -receptor) との組み合わせに比べ非常に弱いことが報告されている⁶⁴⁾。このことは同じ second mediator を介する場合は一方の受容体とそのアゴニストの結合が他の受容体とそのアゴニストとの結合に影響を与え、結合能に変化が生じるからであるといわれていたが、受容体結合実験等ではそのような結果は得られていない⁷⁰⁾。一方、この現象は受容体以後の細胞内経路の中で生じるという説がある⁶⁴⁾。今回の細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇は両薬物による細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇の和までの値にならないということで互いに細胞内 Ca^{2+} 動員を抑制しているように見受けられるが、データとして示していないが、互いに低濃度を組み合わせた実験では細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇は両薬物の細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇の和に近い値になる。このことから両薬物とも同一の細胞内 Ca^{2+} 貯蔵部位より Ca^{2+} を遊離するものと考えられ、今回示したようなほぼ submaximum の投与量の両薬物を組み合わせたときの反応は細胞内 Ca^{2+} 貯蔵量の上限に達したからであると考えられる。

受容体刺激による cAMP の増加に伴い細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇が減少するという報告が胃粘膜主細胞以外の研究でなされている⁷¹⁾。しかし、今回の主細胞における細胞内 Ca^{2+} の検討では secretin と forskolin は IBMX の有無に関係なく carbachol 又は CCK-8 による細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇に影響をおよぼさなかった。他方、cAMP の産生に関しては carbachol と CCK-8 は secretin による cAMP 産生を減少させ、その減少は CCK-8 との組み合わせの方が強かった。逆に、forskolin による cAMP 産生については、CCK-8 との組み合わせの方が強く増加させた。これらの結果は細胞内情報伝達系の異なる薬物を組み合わせるこ

とによる pepsinogen 分泌の相乗作用の違いが cAMP の増減によるのではないかと考えさせる証拠となる。

Carbachol と CCK-8 は受容体と結合後、 Ca^{2+} と DG が協同して pepsinogen 分泌を促進することを示唆した報告がある^{35,67)}。そこで、secretin や forskolin による cAMP 産生に対して A23187 及び PMA を用い検討したが、影響は認められなかった。但し、わずかに secretin による cAMP 産生に対して A23187 の 1×10^{-6} M では減少させている。しかし、この A23187 の濃度は細胞に対してかなり高い濃度であり、細胞内 Ca^{2+} 濃度の増加によって示された高い pepsinogen 分泌は必ずしも生理的な反応とは考え難い。従って、この cAMP 減少は細胞内 Ca^{2+} 濃度の増加に基づく細胞内機能の破壊とも考えられる。壁細胞を用いた研究で、活性化された protein kinase C は histamine による cAMP 産生を減少させるという報告がある⁷²⁾。しかし、protein kinase C の活性化剤である PMA はモルモット主細胞において prostaglandin E_2 による cAMP 産生を抑制するが、secretin や他の cAMP 産生を刺激する薬物による cAMP 産生については抑制しないという報告があり⁷³⁾、ラットでの結果とも一致している。このことから PMA によって活性化された protein kinase C は促進性及び抑制性 G protein や adenylate cyclase 系に対しては影響しないことが示唆された。

他方、carbachol 及び CCK-8 は secretin による cAMP 産生を減少させた。ムスカリン受容体拮抗薬である atropine は carbachol によるこの減少を完全に打ち消し、また、 CCK_A 受容体拮抗薬である lorglumide もまた CCK-8 による減少を完全に回復させた。そして、これらの IC_{50} 値は atropine や lorglumide によって抑制された pepsinogen 分泌及び細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇の IC_{50} とほとんど同じであった。従って、carbachol と CCK-8 によって引き起こされた secretin の cAMP 産生に対する減少作用はそれぞれの受容体間で起こる生理的な調節ではないかと考えられる。これらの現象はどのような機序で調節されるか

は明らかにできなかったが、主細胞においては細胞内刺激伝達機序の異なる受容体間で "cross-talk" が起こっていることが示唆された。

一般に、高い pepsinogen 分泌は高い酸分泌に伴って起こる。*In vivo* の実験において secretin の単独投与は pepsinogen の基礎分泌量をわずかに増加させたにすぎなかった。しかし、secretin は酸分泌を刺激する histamine の持続静注時に明らかに pepsinogen 分泌作用を示した。これらのことから酸分泌に伴った pepsinogen の "wash out" は生体における消化活動にとっては重要であると考えられる。

Secretin と CCK は酸性の胃内の消化物が十二指腸へと移り、その刺激により十二指腸粘膜から内分泌され、膵酵素や重炭酸イオンを外分泌させる²³⁾と同時に胃酸分泌を抑制すると言われている^{74,75)}。しかし、現在この酸分泌抑制は、secretin や CCK による直接作用ではなく、それらによって分泌された somatostatin が関与していると考えられている⁷⁶⁻⁸⁰⁾。以上のことを考えあわせるとき、胃液中に同時に分泌されているようにみえる pepsinogen と酸とは著者がここに示したように、同じ分泌調節を受けているわけではないことに気がつく。ここで、胃における消化の過程を考えると、次のようになる。すなわち、摂取される食物を前にして、人は視覚や臭覚により迷走神経 (acetylcholine) 系が興奮し、酸と pepsinogen 分泌が起こる (脳相)。食事を摂ると味覚や胃内に入った食物により反射的に壁在神経叢が働き、ホルモンやオータコイドが分泌され、これらは互いに相乗的に作用し胃液の分泌と胃運動が亢進し、本格的な消化活動を始める (胃相)。この間、食物中の流動物は容易に十二指腸へ移行し、十二指腸粘膜から secretin と CCK が分泌される (腸相) と考えられる。しかし、胃において摂取された固形の食物は継続的に消化され粥状になるまで行われる。この時の主役は胃の蠕動運動と pepsin であると考えられる。食事中、胃は引き続き迷走神経 (acetylcholine) 系によって刺激されている。Acetylcholine 刺激は酸や pepsinogen を分泌するばかりでなく、D cell (somatostatin 含有細胞) から

の somatostatin の分泌を抑制する^{81,82)}。従って、胃での食物の消化中には acetylcholine が secretin や CCK と協同的に働いて pepsinogen を相乗的に分泌し、酸と共に胃腔内へ分泌され固形物の消化を行うと考えられる。同時に、secretin や CCK による somatostatin 分泌は acetylcholine により抑制されていると考えられる。食後、胃は acetylcholine の刺激がなくなり、今度は secretin や CCK によって somatostatin が分泌され胃での外分泌は抑制されると推測される。Chiba 等は摘出したラット胃の灌流実験において somatostatin と gastrin 分泌における secretin の影響について検討し、secretin は濃度依存的に somatostatin 分泌を増加させ、逆に gastrin 分泌を減少させることを見出した⁷⁷⁾。Soll 等はイヌ胃底腺粘膜 D cell から CCK-8 が強く somatostatin を分泌させることを報告した⁷⁹⁾。第2章で示したように somatostatin は CCK-8 や secretin によって刺激された pepsinogen 分泌を抑制する。さらに、著者は somatostatin が secretin による cAMP の産生を抑制することを確認した。従って、食後は Fig. 30 で示したように secretin による cAMP の産生が somatostatin と CCK-8 によって抑えられていることが考えられる。さらに、*in vivo* 実験で示したように酸分泌が高まったとき pepsinogen は同時に胃腔内へ分泌されるということからも、食後酸分泌が抑制されれば pepsinogen も胃腔内へは流れでないものと考えられる。以上のことから主細胞における CCK-8 の secretin による cAMP 産生作用に対する抑制は過剰な pepsinogen 分泌を回避するための相互作用ではないかと考えられる。このように主細胞からの pepsinogen 分泌は食物の消化の過程に伴い、壁細胞からの酸分泌と共に合目的調節を受けているのではないかと考えられる。

現在、H₂ブロッカーやプロトンポンプ阻害剤といった酸分泌抑制剤の開発によって消化性潰瘍の治療は飛躍的に進歩している。しかし、潰瘍の発症や再発の機序に関してはまだ未知な部分が多く残っている。発症の主な原因にストレスが挙げられているが、これが acetylcholine, CCK や secretin さらには somatostatin

といった pepsinogen 分泌の促進や抑制に関わる生理活性物質のバランスの乱れを引き起こし、消化性潰瘍発症の補助因子として働いているのではないかと考えられる。

結 論

ラット胃粘膜主細胞の機能と pepsinogen 分泌の調節に関する研究において以下の結論を得た。

1. 胃粘膜主細胞の単離と pepsinogen 及び intrinsic factor の分泌に関する基礎的検討

酸分泌実験、消化管ホルモンのバランスや作用等の実験、実験潰瘍の作製、抗潰瘍剤評価等の基礎的検討にはほとんどラットが用いられてきた。しかし、pepsinogen 分泌実験や胃粘膜遊離細胞からの主細胞の分離はこれまでイヌやモルモット等の動物が用いられ、ラット胃主細胞を用いた pepsinogen 分泌の研究がなかった。そこで、ラット主細胞を単離することを試みた。すなわち、ラットの摘出した胃を反転し、medium で膨らませ、Dispase I を含む medium 中で消化し遊離細胞を得て、密度勾配遠心分離法により主細胞を分離した。この細胞が pepsinogen 及び内因子を含有することを組織免疫染色法により確認し主細胞として以下の実験に供した。この細胞を1日培養し、種々刺激物質を用いて pepsinogen 分泌を検討した。ラット胃主細胞からの pepsinogen 分泌は副交感神経刺激薬の carbachol、十二指腸から分泌される消化管ホルモンの CCK-8 や secretin により強く促進された。そして、酸分泌の促進物質である histamine や gastrin は pepsinogen 分泌をほとんど刺激しなかったが、交感神経刺激薬はわずかに促進しただけであった。そこで、pepsinogen 分泌刺激物質の作用機序について検討した。Carbachol や CCK-8 の刺激により主細胞の細胞内 Ca^{2+} 濃度は上昇し、その上昇は medium 中の Ca^{2+} がなくても認められたことから phospholipase C を介したイノシトールリン脂質の代謝による IP_3 の産生に伴っ

た細胞内 Ca^{2+} 貯蔵部位からの放出が関与していることを確認した。Secretin の刺激により用量依存的に細胞内 cAMP の産生が促進され pepsinogen 分泌と同様の用量反応曲線を示したので、secretin は cAMP を介して pepsinogen を分泌させることが確認された。

IF の分泌は胃内灌流法を用いた *in vivo* 実験により、pepsinogen と類似した分泌パターンを示した。また、培養ラット主細胞を用いた *in vitro* 実験により、IF 分泌は pepsinogen 分泌と同様の分泌を示した。このことから IF と pepsinogen は同じ機序で主細胞から分泌されることが示唆された。

2. Pepsinogen 分泌に対する somatostatin の影響

Pepsinogen 分泌に対する somatostatin の作用を胃内灌流法により *in vivo* で検討したが、抑制の傾向が認められたものの明確な結果が得られなかった。遊離した主細胞を用いた検討では somatostatin は carbachol, CCK-8 及び secretin の刺激による pepsinogen 分泌を抑制した。Somatostatin は carbachol や CCK-8 の刺激によって引き起こされた細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇に影響を及ぼさず、pepsinogen 分泌を抑制した。以上より、somatostatin は少なくとも Ca^{2+} チャンネルや phospholipase C の活性化によるイノシトールリン脂質の代謝には影響を及ぼさないことが示唆された。Secretin による cAMP 産生に対して somatostatin は抑制的に作用した。さらに、主細胞を pertussis toxin で 24 h 前処理することによって somatostatin の pepsinogen 分泌抑制作用が阻害された。このことから、somatostatin 受容体は inhibitory guanine nucleotide binding protein (Gi or Go) に共役した受容体であることが確認された。しかし、forskolin による pepsinogen 分泌は pertussis toxin の有無に関係なく somatostatin により抑制されたことから、somatostatin 受容体 - Gi 系以外にも somatostatin の作用部位があることが考えられた。

3. Pepsinogen 分泌に対する分泌促進物質間の相互作用

細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇を引き起こす carbachol と CCK-8 を併用しても細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇及び pepsinogen 分泌共に相乗効果を示さなかった。しかし、細胞内情報伝達機序の異なる secretin と carbachol 又は CCK-8 とを組み合わせると pepsinogen 分泌に相乗作用が認められた。Secretin と CCK-8 の相乗作用は secretin と carbachol の相乗作用より弱く、また forskolin との組み合わせによる pepsinogen 分泌の相乗作用は secretin とのそれより強い作用を示した。この現象に伴って細胞内 cAMP 産生低下が起こるが、細胞内 Ca^{2+} 濃度には何ら変動は起こらなかった。また、carbachol や CCK-8 の secretin によって引き起こされる cAMP 産生の減少は細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇や protein kinase C の活性化によるものでもないことが確認された。Carbachol や CCK-8 によるこの減少はそれぞれの競合的拮抗薬により阻害され、その IC_{50} 値は細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇や pepsinogen 分泌に対する IC_{50} 値とほぼ同じ値であることから受容体を介する作用で起こっていることが示唆された。

以上のことから、異なった second mediator を介する分泌促進物質間の相互作用では相乗的に作用し、より少ない刺激で効率良く消化酵素の分泌を促進すると同時に cAMP の産生を調節することにより過剰な反応が起こらないように pepsinogen 分泌を調節している可能性が示唆された。

謝 辞

本研究に際し、終始御懇篤なる御指導並びに御鞭撻を賜りました城西大学薬学部 谷 覺 教授に厚く感謝の意を表します。

本論文の作成にあたり、御校閲と御教示を賜りました 副査 城西大学薬学部 菅谷 愛子 教授、鯨島 啓二郎 教授、荻原 政彦 講師に深く感謝致します。

実験の一部に御協力戴きました城西大学薬学部生物薬品化学教室の諸氏に感謝致します。

実験の部

1. 実験試料

Carbamylcholine chloride (carbachol), bovine serum albumin (BSA) (fraction V), forskolin, L-phenylephrine hydrochloride, DL-isoproterenol hydrochloride, L-epinephrine bitartrate, L-arterenol bitartrate, 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), pertussis toxin, bovine hemoglobin は Sigma 社から、cholecystokinin octapeptide (sulfated form), secretin, somatostatin, gastrin I, はペプチド研究所から購入した。Dispace I は合同酒精 (株) より、Sephadex 4B, Sephadex G-75, Percoll は Pharmacia KLB Biotechnology より、fura 2-acetoxymethyl ester (fura 2-AM) 及び N-2-hydroxyethyl-piperazine-N'-2-ethanesulfonic acid (HEPES), ethyleneglycol-bis(β-aminoethyl ether)-N,N,N',N',-tetraacetic acid (EGTA) は同仁化学研究所より、A23187 は Calbiochem corp. より、horseradish peroxidase avidin D は Vector Laboratories, Inc. より、sodium Iorglumide は Research Biochemicals Inc. より、foetal calf serum (FCS) 及び Ham's F-12/Dulbecco's Modified Eagle's 1:1 Mixture は (株) アイエスジャパン より、tetragastrin はメクト社より購入し、cyanocobalamin (CN-Cbl), hydroxocobalamin (OH-Cbl) acetate, o-phenylenediamine, histamine dihydrochloride, sodium dibutyryl cAMP, atropine sulfate monohydrate, phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) は和光純薬 (株) より購入した。¹⁴CN-Cbl は K¹⁴CN (ICN Biomedicals より購入) で OH-Cbl を置換して作成された。その他の試薬は市販の特級品を購入し用いた。

2. 実験動物

雄性ラット（Wistar、6 週令、約 200 g）を東京実験動物（株）より購入した。

3. 胃粘膜遊離細胞の調整

24時間絶食した Wistar 系雄性ラット（体重約 200-300 g）をウレタン麻醉下に開腹し噴門部及び幽門部を結紮して胃を摘出した。次いで前胃部を切開し反転させ、内部に 95 % O₂ + 5 % CO₂ 混合ガスで通気した medium C をゾンデを用いて注入し胃を膨らませ胃粘膜表面の粘液を拭い去った後、Dispase I (1000 U/ml) を含む medium A 中で通気しながら 37 °C 60 min 消化した。次に、medium B に移し室温でピペットを用いゆっくりと胃粘膜表面から細胞を遊離させた。遊離された胃粘膜細胞を 150 mesh ナイロンフィルターで濾過し、50 × g、3 min の遠心を行った。沈殿した細胞は medium C に懸濁された。

medium A : 0.5 mM NaH₂PO₄, 1.0 mM Na₂HPO₄, 20 mM NaHCO₃, 70 mM NaCl, 5.0 mM KCl, 11 mM glucose, 25 mM HEPES and 10 mg/ml BSA (pH 7.3)

medium B : 2.0 mM EDTA in medium A

medium C : 1.0 mM CaCl₂, 1.5 mM MgCl₂, in medium A (1 mg/ml BSA)

4. 胃粘膜遊離細胞からの主細胞の分離

上記の方法により調整された胃粘膜遊離細胞を 30 % Percoll 細胞懸濁液として 45 % Percoll 溶液上に重層し、1200 × g、5 min の遠心を行い 45 % Percoll 層に沈殿した細胞分画を主細胞分画とした。この細胞を medium C で洗浄し主細胞を調整した。

5. 主細胞の培養

調整された主細胞は Dulbecco's modified Eagle medium/Ham's F12 medium 1 : 1 混合培養液 (100 U/ml penicillin, 0.1 mg/ml streptomycin を含む) で 2 回洗浄後、10 % foetal calf serum を含む培養液に懸濁し collagen coated dish に 2×10^5 cells/dish となるように調整し、CO₂ インキュベーターで 5 % CO₂ 下、37 °C で培養した。

6. 培養した主細胞からの pepsinogen 分泌

培養液を 37 °C に温められた FCS を含まない培養液と置換し 30 min インキュベートした後、37 °C に温められた medium C で 2 回細胞を洗浄後、medium C を 2 ml 加え 37 °C 15 min プレインキュベーションした。この時点の pepsinogen の値を blank とした。その後、各試薬を加え 37 °C 30 min 反応させ上清を分取しサンプルとした。Pepsinogen の分泌量は細胞を凍結融解で破壊し全 pepsinogen 量を求め、その量に対する割合すなわち % total で表わした。

7. 細胞内カルシウムの測定³³⁾

調整した主細胞への fura-2 の負荷は fura-2 acetoxymethylester (fura-2 AM) $0.1 \mu\text{mol}/10^6$ cells/ml を添加し、通気しながら 37 °C 15 min インキュベーションした。負荷した細胞を medium C で 2 回洗浄して 2×10^6 cells/ml に調整し測定に用いた。測定機器は島津分光蛍光光度計 RF-5000 を用い、測定条件は励起光 340 nm, 380 nm の 2 波長励起を行い、蛍光を 500 nm のフィルターを介して測定し 340 nm/380 nm 蛍光比で表わした。

8. cAMP の測定⁸³⁾

調整した主細胞を 2×10^6 cells/ml に調整後、IBMX 1×10^{-4} M 存在下、各試薬を添加し 37 °C 10 min インキュベーションした後、 $10000 \times g$, 30 sec 遠心し沈殿した主細胞に 6 % TCA を加え攪拌し、cAMP を抽出した。次に、得られたサンプルの 3 倍量の水飽和エーテルで TCA を除いた後、Yamasa cAMP assay kit を用いて cAMP の定量を行った。後に、Amersham 社から cAMP EIA (enzymeimmunoassay) system が販売され assay 系を変更した。

9. ラット pepsinogen の avidin-biotin complex enzyme linked

immunosorbentassay (abc-ELISA) 系を用いた定量

精製した pepsinogen を用い、ウサギ抗ラット pepsinogen 抗体の作製を常法どおりに行った。得られた抗血清を硫酸分画、DEAE-cellulose を用いたイオン交換クロマトグラフィーで IgG 分画まで精製し 10 μ g/ml に希釈したものを第 1 次抗体として 96 well ELISA 用プレートに固相化した。dimethylsulfoxide に溶かした biotin-hydroxysuccinimide と精製された IgG を混合し、biotin 化ラット pepsinogen IgG を作製し 10 μ g/ml に希釈したものを第 2 次抗体として用いた。酵素に peroxidase、基質溶液に 0.6 % H_2O_2 , 0.2 % o-phenylenediamine を含む citrate buffer、反応停止液に 2 M H_2SO_4 を用い、マイクロプレートリーダーにて 490 nm のフィルターを介し吸光度を測定した。これら一連の操作を以下に示す。

Step 1. Immobilization

- + primary antibody ($1 \mu\text{g} / 100 \mu\text{l} / \text{well}$)
37 °C, 1.5 h or 4 °C, 18 h
wash 3 times with 0.05 % Tween 20 containing saline

Step 2. Blocking

- + 0.1 % BSA and 0.05 % Tween 20 in phosphate buffered saline
($100 \mu\text{l} / \text{well}$)
37 °C, 30 min

Step 3. Sampling

- + sample ($100 \mu\text{l} / \text{well}$)
37 °C, 30 min
wash as described above

Step 4. Sandwich

- + secondary antibody ($1 \mu\text{g} / 100 \mu\text{l} / \text{well}$)
37 °C, 40 min
wash as described above

Step 5. Avidin-Biotin Complex

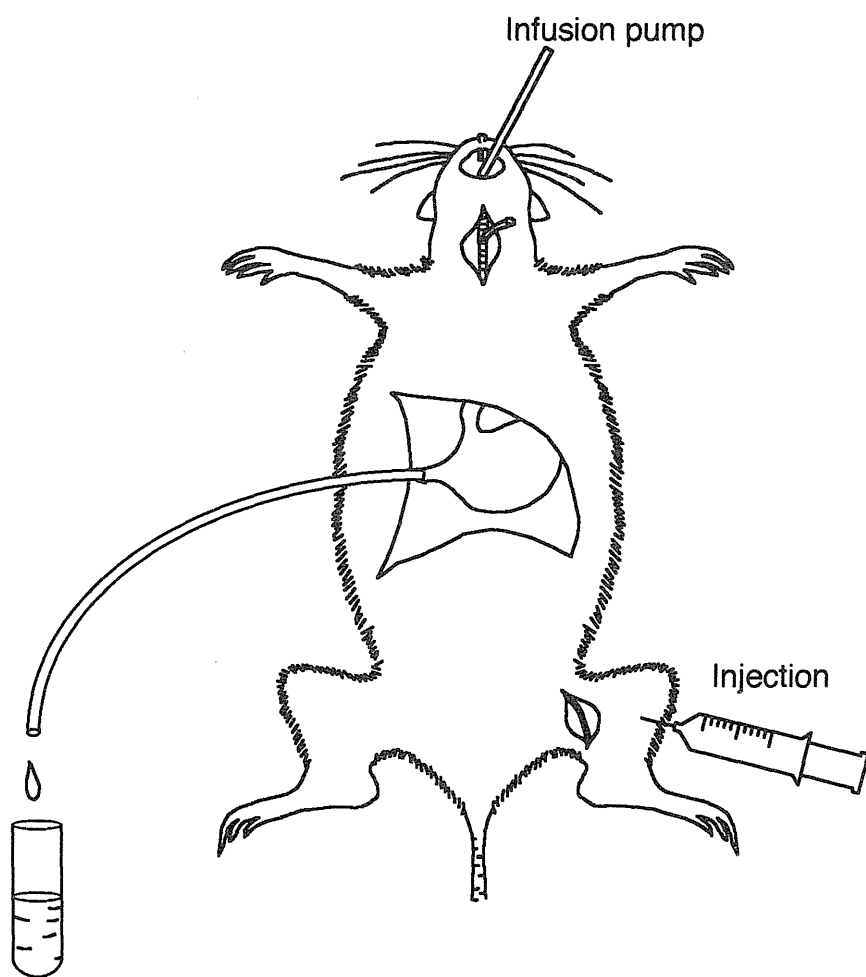
- + horseradish peroxidase avidin D ($0.5 \mu\text{g} / 100 \mu\text{l} / \text{well}$)
37 °C, 40 min
wash as described above

Step 6. Enzyme Reaction

- + substrate: 0.04 % o-phenylenediamine and 0.6 % H_2O_2 containing 0.1 M citrate buffer (pH 5.0) ($100 \mu\text{l} / \text{well}$)
reaction time: 10 min
- + stopper: 2 M H_2SO_4 ($50 \mu\text{l} / \text{well}$)
measurement: absorbance at 490 nm

10. ラット胃内灌流法

体重約 200-250 g のラットを 24 時間絶食後、ウレタン麻醉下に Ghosh & Schild の方法に準じて手術を行った⁸⁴⁾。灌流液に生理食塩水を用いペリスタポンプにて灌流し、薬物は股静脈より投与した。胃を通った灌流液の pepsin 活性を測定し、unit で表わし、酸分泌量は pH メーターを用いて酸の中和に消費される 0.02 N NaOH の量から換算し、 $H^+ \mu Eq/time$ として求めた。



1 1 . Pepsin 活性の測定

Hemoglobin を基質として用いた Anson 等の変法に準じて行った⁸⁵⁾。すなわち、サンプル 100 μ l を 2 % hemoglobin 溶液 (pH 1.8) と混合して 37 $^{\circ}$ C、10 min インキュベートし、5 % TCA 5 ml を加え反応を停止した。遠心後、上清の 280 nm における吸光度を測定し 1 min 当りに吸光度を 1.0 上昇させる pepsin 量を 1 unit として換算した。

1 2 . Cobalamin-binding protein capacity assay⁸⁶⁾

試料 500 μ l を 4 mg/ml BSA を含む 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) 200 μ l と混合し室温で 20 min 放置する。次に、 $[^{14}\text{C}]$ -Cyanocobalamin (^{14}C -Cbl) 10 μ l (約 11000 dpm) を加え室温で 20 min 反応させた。5 % 活性炭 (Norit SX-3)、1 % BSA を含む 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) 500 μ l を加え室温で 15 min 放置させ 9000 \times g、20 min 遠心分離し、上清 1 ml を液体シンチレーションカウンターで測定した。活性は Cbl-binding protein が 1 ng の Cbl と結合する量を 1 unit (bound) とした。

1 3 . ラット胃からの IF の精製⁸⁷⁾

ラット胃ホモジネートの遠心分離した上清をスパーサーとして 3-chloropropylamine で CN-Cbl を結合させた Sepharose 4B アフィニティークロマトグラフィーにサンプリングし、カラムを洗浄後、7.5 M guanidine hydrochloride を含む 0.1 M phosphate buffer で溶出させた。次に、IF 分画を透析、凍結乾燥後、Sephadex G-75 を用いゲル濾過し精製した。精製した IF を SDS-PAGE にて単一でラット IF 標準品と同一バンドであることを確認した。

14. ラット IF の avidin-biotin complex enzyme linked

immunosorbentassay (abc-ELISA) 系を用いた定量

実験9の方法に準じ定量法を確立した。すなわち、実験13により精製した IF を用い IF 抗血清を常法どうり作成した。得られた抗体はラット IF 標準品、精製 IF、胃粘膜ホモジネートとのウエスタンブロットにより 57 kDa に単一の同一バンドであることを確認した³⁹⁾。抗血清を硫酸分画、DEAE-cellulose カラムクロマトグラフィーにて IgG 分画にまで精製し 40 μ g / ml に希釈したものを第1次抗体として 96 well ELISA 用プレートに固相化した。dimethylsulfoxide に溶かした biotin-hydroxysuccinimide と精製された IgG を混合し、biotin 化ラット IF IgG を作製し 40 μ g/ml に希釈したものを第2次抗体として用いた。この時点では非特異的発色が強く低用量での測定が不可能であったのでリウマトイド因子の存在が推測された。そのため、第2次抗体にウサギ正常 IgG 0.3 mg/ml を含む biotin 化 IF 抗体としたところ低用量の測定が可能となり 5×10^{-10} g/100 μ l まで測定が可能となった。酵素に peroxidase、基質溶液に 0.6 % H_2O_2 , 0.2 % o-phenylenediamine を含む citrate buffer、反応停止液に 2 M H_2SO_4 を用い、マイクロプレートリーダーにて 490 nm のフィルターを介し吸光度を測定した。

引用文献

- 1) H. Shay and D.C.H. Sun, *Gastroenterology*, **1**, 420 (1953).
- 2) A.H. Soll, *J. Clin. Invest.*, **61**, 370 (1978).
- 3) D.R. Sutton and R.M. Donaldson, *Gastroenterology*, **69**, 166 (1975).
- 4) C.R. Kapadia and R.M. Donaldson, *Gastroenterology*, **74**, 535 (1978).
- 5) T. Berglinde and K.J. Öbrink, *Acta Physiol. Scand.*, **96**, 150 (1976).
- 6) H.R. Koelz, S.J. Hersey, G. Sachs and C.S. Chew, *Am. J. Physiol.*, **243**, G218 (1982).
- 7) S.J. Hersey, D. May and D. Schyberg, *Am. J. Physiol.*, **244**, G192 (1983).
- 8) D.K. Kasbekar, R.T. Jensen and J.D. Gardner, *Am. J. Physiol.*, **244**, G392 (1983).
- 9) A. Ayalon, M.J. Sanders, L.P. Thomas, D.A. Amirian and A.H. Soll, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 7009 (1982).
- 10) J.-P. Raufman, V.E. Sutliff, D.K. Kasbekar, R.T. Jensen and J.D. Gardner, *Am. J. Physiol.*, **247**, G95 (1984).
- 11) J.-P. Raufman, *Gastroenterology*, **102**, 699 (1992).
- 12) W.B. Castle, *Am. J. Med. Sci.*, **178**, 748 (1929).
- 13) B.K. Dieckgraefe, B. Seetharam, L. Banaszak, J.F. Leykam and D.H. Alpers, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 46 (1988).
- 14) R.M. Donaldson, *Physiology of the Gastrointestinal Tract*, 2nd ed., ed. by L.R. Johnson, Raven Press, New York, pp. 959-973 (1987).
- 15) J.M. Fisher and K.B. Taylor, *Immunology*, **16**, 779 (1969).
- 16) E.Y. Lee, B. Seetharam, D.H. Alpers and K.D. Keckskemeti,

- Gastroenterology*, **97**, 1171 (1989).
- 17) P.J. Hoedemaker, J. Abels, J.J. Wachters and A. Arends, H.O. *Nieweg, Lab. Invest.*, **15**, 1163 (1966).
 - 18) M.J. Sanders, D.A. Amirian, A. Ayalon and A.H. Soll, *Am. J. Physiol.*, **245**, G641 (1983).
 - 19) M. Lewin, A.M. Cheret, A. Soumarmon and J. Girodet, *Biol. Gastroenterol.*, (Paris), **7**, 139 (1974).
 - 20) S. Tani, T. Tanaka, Y. Kudo and M. Takahagi, *Chem. Pharm. Bull.*, **37**, 2188 (1989).
 - 21) V.E. Sutliff, J.-P. Raufman, R.T. Jensen and J.D. Gardner, *Am. J. Physiol.*, **251**, G96 (1986).
 - 22) B.I. Hirschowitz, *Postgrad. Med. J.*, **60**, 743 (1984).
 - 23) B.I. Hirschowitz, J. Rentz and E. Molina, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **218**, 676 (1981).
 - 24) M. Albinus, E.L. Blair, B.H. Hirst, J.D. Reed, A.V. Schally and B. Shaw, *J. Physiol. (London)*, **266**, 801 (1977).
 - 25) J.D. Gardner and R.T. Jensen, *Physiology of the Gastrointestinal Tract*, 2nd ed., ed. by L.R. Johnson, Raven Press, New York, pp. 1109-1127 (1987).
 - 26) J.A. Cherner, V.E. Sutliff, D.M. Grybowski, R.T. Jensen and J.D. Gardner, *Am. J. Physiol.*, **254**, G151 (1988).
 - 27) V.E. Sutliff, J.A. Cherner, R.T. Jensen and J.D. Gardner, *Biochim. Biophys. Acta*, **1052**, 9 (1990).
 - 28) J.-M. Qian, W.H. Rowley and R.T. Jensen, *Am. J. Physiol.*, **264**, G718 (1993).
 - 29) R.Y. Tsien, *Biochemistry*, **19**, 2396 (1980).

- 30) G. Gryniewicz, M. Poenie and R.Y. Tsien, *J. Biol. Chem.*, **260**, 3440 (1985).
- 31) 唐木英明, 工藤佳久, 栗山熙 (編), *実験医学*, **7**, (1989).
- 32) J.-P. Raufman, S. Berger, L. Cosowsky and E. Straus, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **137**, 281 (1986).
- 33) Y. Tsunoda, *Biochim. Biophys. Acta*, **901**, 35 (1987).
- 34) C. Sakamoto, T. Matozaki, M. Nagao, H. Nishizaki and S. Baba, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **142**, 865 (1987).
- 35) Y. Tsunoda, H. Takeda, T. Otaki, M. Asaka, I. Nakagaki and S. Sasaki, *Biochim. Biophys. Acta*, **941**, 83 (1988).
- 36) Y. Tsunoda, J.A. Williams and J. DelValle, *Biochim. Biophys. Acta*, **1091**, 251 (1991).
- 37) C.S. Chew, *Am. J. Physiol.*, **250**, G814 (1986).
- 38) J.-P. Raufman and L. Cosowsky, *J. Cell. Physiol.*, **132**, 137 (1987).
- 39) S. Tani, S. Kobayashi and T. Tanaka, *Biol. Pharm. Bull.*, **17**, 1333 (1994).
- 40) W. Schepp, S.E. Miederer and H.-J. Ruoff, *Biochim. Biophys. Acta*, **804**, 192 (1984).
- 41) R. Guillemin and J.E. Gerich, *Annu. Rev. Med.*, **27**, 379 (1976).
- 42) L.-I. Larsson, N. Goltermann, L. Magistris, J.F. Rehfeld and T.W. Schwartz, *Science*, **205**, 1393 (1979).
- 43) S.J. Konturek, *Gastrointestinal Hormones*, ed. by G.B.J. Glass, Raven Press, New York, pp. 693-716 (1980).
- 44) S.R. Bloom, C.H. Mortimer, M.O. Thorner, G.M. Besser, R. Hall, A. Gomez-Pan, V.M. Roy, R.C.G. Russell, D.H. Coy, A.J. Kastin and A.V. Schally, *Lancet*, **2**, 1106 (1974).

- 45) M.M. Wolfe, G.M. Reel and J.E. McGuigan, *J. Clin. Invest.*, **72**, 1586 (1983).
- 46) J. Park, T. Chiba and T. Yamada, *J. Biol. Chem.*, **262**, 14190 (1987).
- 47) A. Zink, H. Scherübl, D. Kliemann, M. Höflich, R. Ziegler and F. Raue, *Mol. Cell. Endocrinol.*, **86**, 213 (1992).
- 48) K. Matsushita, Y. Okabayashi, H. Hasegawa, M. Koide, Y. Kido, T. Okutani, Y. Sugimoto and M. Kasuga, *Gastroenterology*, **104**, 1146 (1993).
- 49) H. Scherübl, J. Hescheler and E.O. Riecken, *Horm. Metab. Res.*, **27**, 1 (1993).
- 50) C. Gespach, C. Dupont, D. Bataille and G. Rosselin, *FEBS Lett.*, **114**, 247 (1980).
- 51) S. Batzri, *Biochim. Biophys. Acta*, **677**, 521 (1981).
- 52) C.S. Chew, *Am. J. Physiol.*, **245**, G221 (1983).
- 53) S.-J. Hong, L.-W. Ko, L.-T. Ho and J.C. Fong, *Biochim. Biophys. Acta*, **968**, 401 (1988).
- 54) J.C. Fong, S.-J. Hong and F.-F. Wang, *Regul. Pept.*, **32**, 351 (1991).
- 55) C. Linard, F. Reyl-Desmars and M.J.M. Lewin, *Regul. Pept.*, **41**, 219 (1992).
- 56) A. Zink and F. Raue, *Acta Endocrinol.*, **127**, 378 (1992).
- 57) M.T. Lee, C. Liebow, A.R. Kamer and A.V. Schally, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 1656 (1991).
- 58) C. Chen, J. Zhang, J.-D. Vincent and J.-M. Israel, *Am. J. Physiol.*, **259**, C854 (1990).
- 59) B.D. Gomperts, *Annu. Rev. Physiol.*, **52**, 591 (1990).
- 60) Y. Yamada, S.R. Post, K. Wang, H.S. Tager, G.I. Bell and S. Seino,

- Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 251 (1992).
- 61) K. Yasuda, S. Rens-Domiano, C.D. Breder, S.F. Law, C.B. Saper, T. Reisine and G.I. Bell, *J. Biol. Chem.*, **267**, 20422 (1992).
- 62) J.D. Gardner and R.T. Jensen, *Physiology of the Gastrointestinal Tract*, ed. by L.R. Johnson, Raven Press, New York, pp. 831-871 (1981).
- 63) E. Dial, W.J. Thompson and G.C. Rosenfeld, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **219**, 585 (1981).
- 64) A.H. Soll, *Gastroenterology*, **83**, 216 (1982).
- 65) J.L. Cabero, Z.-Q. Li and S. Mårdh, *Am. J. Physiol.*, **261**, G621 (1991).
- 66) J.-P. Raufman and L. Cosowsky, *J. Biol. Chem.*, **262**, 5957 (1987).
- 67) H. Matsumoto, K.E.J. Dickinson, T. Shirakawa, K. Komiyama and B.I. Hirschowitz, *Am. J. Physiol.*, **253**, G557 (1987).
- 68) J.-P. Raufman, D.K. Kasbekar, R.T. Jensen and J.D. Gardner, *Am. J. Physiol.*, **245**, G525 (1983).
- 69) R.T. Jensen, C.G. Charlton, H. Adachi, S.W. Jones, T.L. O'donohue and J.D. Gardner, *Am. J. Physiol.*, **245**, G186 (1983).
- 70) R. Ecknauer, W.J. Thompson, L.R. Johnson and G.C. Rosenfeld, *Am. J. Physiol.*, **239**, G204 (1980).
- 71) K.S. Murthy, C. Severi, J.R. Grider and G.M. Makhlouf, *Am. J. Physiol.*, **264**, G967 (1993).
- 72) J.F. Emly and P.J. Hanson, *Agents Actions*, **37**, 25 (1992).
- 73) J.-P. Raufman and L. Cosowsky, *J. Cell. Physiol.*, **140**, 91 (1989).
- 74) K.C.K. Lloyd, H.E. Raybould and J.H. Walsh, *Am. J. Physiol.*, **263**, G287 (1992).
- 75) K. Shiratori, S. Watanabe and T. Takeuchi, *Digestion*, **54**, 163 (1993).
- 76) M.M. Wolf, G.M. Reel and J.E. McGuigan, *J. Clin. Invest.*, **72**, 1586

- (1983).
- 77) T. Chiba, T. Taminato, S. Kadowaki, H. Abe, K. Chihara, Y. Seino, S. Matsukura and T. Fujita, *Gastroenterology*, **79**, 67 (1980).
- 78) T. Yamada, A.H. Soll, J. Park and J. Elashoff, *Am. J. Physiol.*, **247**, G567 (1984).
- 79) A.H. Soll, D.A. Amirian, J. Park, J.D. Elashoff and T. Yamada, *Am. J. Physiol.*, **248**, G569 (1985).
- 80) A.M.J. Buchan, R.M. Meloche, Y.N. Kwok and H. Kofod, *Gastroenterology*, **104**, 1414 (1993).
- 81) T. Chiba, K. Raffoul and T. Yamada, *J. Biol. Chem.*, **262**, 8467 (1987).
- 82) T. Chiba, T. Fujita and T. Yamada, *Am. J. Physiol.*, **257**, G308 (1989).
- 83) A.L. Steiner, A.S. Pagliara, L.R. Chase and D.M. Kipnis, *J. Biol. Chem.*, **247**, 1114 (1972).
- 84) M.N. Ghosh and H.O. Schild, *Brit. J. Pharmacol.*, **13**, 54 (1958).
- 85) M.L. Anson and A.E. Mirsky, *J. Gen. Physiol.*, **17**, 151 (1933).
- 86) C. Gottlieb, K.-S. Lau, L.R. Wasserman and V. Herbert, *Blood*, **25**, 875 (1965).
- 87) D.W. Jacobsen and F.M. Huennekens, *Methods in Enzymology*, Vol. **123**, Academic Press, New York, pp. 28-36 (1986).